



UNAP



Facultad de Enfermería
Maestría en Salud Pública

**METABOLITOS SECUNDARIOS, ACTIVIDAD
CITOTÓXICA Y ANTIINFLAMATORIA
DE SEIS ESPECIES VEGETALES
PROVENIENTES DE LA
AMAZONÍA PERUANA,
IQUITOS - 2019**

Tesis para optar el grado académico de Maestro en Salud
Pública

Presentado por: Mario Javier De la Cruz Flores

Asesor(es): Dra. Dora Enith García de Sotero
Dr. Víctor Erasmo Sotero Solís

Iquitos - Perú

2019



UNAP



Facultad de Enfermería
Maestría en Salud Pública

**METABOLITOS SECUNDARIOS, ACTIVIDAD
CITOTÓXICA Y ANTIINFLAMATORIA
DE SEIS ESPECIES VEGETALES
PROVENIENTES DE LA
AMAZONÍA PERUANA,
IQUITOS - 2019**

Tesis para optar el grado académico de Maestro en Salud
Pública

Presentado por: Mario Javier De la Cruz Flores

Asesor(es): Dra. Dora Enith García de Sotero
Dr. Víctor Erasmo Sotero Solís

Iquitos - Perú

2019



UNAP

Escuela de Postgrado "JOSÉ TORRES VÁSQUEZ"
Oficina de Asuntos Académicos



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

044-2019-OAA-EPG-UNAP

Con Resolución Directoral N° 0541-2019-EPG-UNAP, se autoriza la sustentación de la tesis: "METABOLITOS SECUNDARIOS, ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTIINFLAMATORIA DE SEIS ESPECIES VEGETALES PROVINIENTES DE LA AMZONÍA PERUANA, IQUITOS - 2019", designando como jurados a los siguientes profesionales:

Dra. Rossana Torres Silva	Presidente
Dra. Frida Enriqueta Sosa Amay	Miembro
Dr. Luis Domingo Nonato Ramírez	Miembro
Dra. Dora Enith Garcia de Sotero	Asesora
Dr. Victor Erasmo Soreto Solis	Asesor

A los Veintisiete días del mes de Mayo del 2019, a horas 2:00 p.m., en el Auditorio de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, se constituyó el Jurado Evaluador y dictaminador, para presenciar y evaluar la sustentación de la tesis: "METABOLITOS SECUNDARIOS, ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTIINFLAMATORIA DE SEIS ESPECIES VEGETALES PROVINIENTES DE LA AMZONÍA PERUANA, IQUITOS - 2019" presentado por el señor **Mario Javier de la Cruz Flores**, como requisito para obtener el Grado Académico de **Maestro en Salud Pública**, que otorga la UNAP de acuerdo a la Ley Universitaria N° 30220 y el Estatuto de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.

Después de haber escuchado la sustentación y luego de formuladas las preguntas, éstas fueron:

.....
Resueltas en su mayoría.....
.....

El Jurado, después de la deliberación correspondiente en privado, llegó a las siguientes conclusiones. la sustentación es:

1. Aprobado como: a) Excelente () b) Muy bueno () c) Bueno (X)

2. Desaprobado: ()

Observaciones : *Ninguna*.....
.....
.....

A Continuación, el Presidente del Jurado, da por concluida la sustentación, siendo las *3:45* p.m. del Veintisiete de Mayo del 2019; con lo cual, se le declara al sustentante *Apto* para recibir el Grado Académico de **Maestro en Salud Pública**.

Rossana Torres Silva
Dra. Rossana Torres Silva
Presidente

Frida Enriqueta Sosa Amay
Dra. Frida Enriqueta Sosa Amay
Miembro

Luis Domingo Nonato Ramirez
Dr. Luis Domingo Nonato Ramirez
Miembro

Dora Enith Garcia de Sotero
Dra. Dora Enith Garcia de Sotero
Asesora

Victor Erasmo Soreto Solis
Dr. Victor Erasmo Soreto Solis
Asesor

TESIS APROBADA EN SUSTENTACION PÚBLICA EL 27 DE MAYO DEL 2019 EN EL AUDITORIO DE LA ESCUELA DE POSTGRADO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA, EN LA CIUDAD DE IQUITOS – PERÚ.


Dra. Rossana Torres Silva
Presidente


Dra. Frida Enriqueta Sosa Amay
Miembro


Dr. Luis Domingo Nonato Ramirez
Miembro


Dra. Dora Enith Garcia de Sotero
Asesora


Dr. Víctor Erasmo Sotero Solís
Asesor

DEDICATORIA

*A **Dios todopoderoso** que hizo los cielos y la tierra, y todo lo que en ello hay. Autor del amor, la vida y la ciencia; quien me mostró un propósito, el cual yo abasé.*

*A mis **padres**: Manuela de Jesús Flores Núñez y Sergio De la Cruz Peralta (quien descansa en paz), porque son el motor y apoyo incondicional para llegar a ser un profesional.*

*A mis **hijas** Evelyn Gabriela De la Cruz Babilonia y Maricielo Samantha De la Cruz Babilonia, quienes son mi adoración, motivación e inspiración por seguir adelante.*

*A mi **hermano** Serman De la Cruz Flores, quien me brinda el apoyo incondicional por salir adelante y seguir superándome día a día.*

AGRADECIMIENTO

A Dios por la vida, perseverancia y fuerza para ser mejor persona, por las pruebas que a diario tengo que soportar y esto me enseña a no rendirme ante los obstáculos que se me presenta en el camino; y gracias a EL estoy aquí de pie, con los deseos de cumplir con mis objetivos, para seguir siendo una persona y profesional de bien.

A los todos los docentes de la maestría en Salud Pública de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana – UNAP, por haberme impartido conocimientos, educación y valores.

A la Fundación para el Desarrollo Sostenible de la Amazonía Baja - FUNDESAB y CIENCIA ACTIVA, quienes hicieron posible el financiamiento total de este proyecto de investigación, apostando toda su confianza en mi persona, logrando todos los objetivos y metas durante la realización del trabajo.

A la Dra. Dora Enith García de Sotero y al Dr. Víctor Erasmo Sotero Solís, quienes con su apoyo, guía, conocimientos científicos y paciencia; han permitido desarrollar y terminar de manera favorable ésta tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
Carátula	i
Contracarátula	ii
Acta de sustentación	iii
Jurados	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Índice de contenido	vii
Índice de tablas	ix
Índice de figuras	x
Resumen	1
Abstract	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO I: MARCO TEÓRICO	
1.1 Antecedentes	5
1.2 Bases teóricas	8
1.3 Definición de términos básicos	23
CAPITULO II: VARIABLES E HIPÓTESIS	
2.1 Variables y su operacionalización	24
2.2 Formulación de la hipótesis	28
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	
3.1 Tipo y diseño de investigación	29
3.2 Población y muestra	29
3.3 Técnicas e instrumentos	30
3.4 Procedimiento de recolección de datos	30
3.5 Técnicas de procesamiento y análisis de datos	38
3.6 Aspectos éticos	38
CAPITULO IV: RESULTADOS	
Actividad citotóxica	40
Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	43
Actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i>	44
Metabolitos secundarios	46

CAPITULO V: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	48
CAPITULO VI: PROPUESTA	50
CAPITULO VII: CONCLUSIONES	51
CAPITULO VIII: RECOMENDACIONES	52
CAPITULO IX: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXOS	61

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Modelo experimental antiinflamatorio <i>in vivo</i>	36
Tabla 2	Cantidad de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> inyectados - citotoxicidad	40
Tabla 3	Conteo de nauplios vivos y muertos de <i>Artemia franciscana</i> en las disoluciones	41
Tabla 4	Cálculo del porcentaje de efecto, valores probit relacionados y CL ₅₀	42
Tabla 5	Porcentaje de inhibición antiinflamatoria – actividad antiinflamatorio <i>in vitro</i>	43
Tabla 6	Cálculo de IC ₅₀ a partir de la ecuación obtenida con su respectivo R ²	43
Tabla 7	Administración de extractos, según tratamiento y tiempo – actividad antiinflamatorio <i>in vivo</i>	44
Tabla 8	Porcentajes de inflamación de cada tratamiento	45
Tabla 9	Cuantificación de componentes químicos	46
Tabla 10	Cuantificación de componentes químicos alcaloides	47
Tabla 11	Cuantificación de componentes químicos saponinas	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Dilución del extracto para el experimento citotoxicidad	62
Figura 2. Configuración del experimento citotoxicidad	62
Figura 3. Flujograma de preparación de extractos hidroalcohólicos (etanólico)	63
Figura 4. Hoja de trabajo_ensayo de toxicidad por <i>Artemia franciscana</i>	64
Figura 5. Hoja de trabajo_conteo de larvas vivas/muertas de <i>Artemia franciscana</i>	65
Figura 6. Hoja de trabajo_preparación de extracto	66
Figura 7. Flujograma del ensayo de la actividad citotóxica	67
Figura 8. Flujograma del ensayo de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	68
Figura 9. Flujograma del ensayo de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	69
Figura 10. Constancia de certificación de especies vegetales	70

RESUMEN

El objetivo fue determinar metabolitos secundarios, actividad citotóxica y antiinflamatoria de seis especies vegetales: corteza *V. pseudolea* Rusby, *G. macrophylla* Mart., *R. pedunculata* (H. Karst.) Flueck, *G. ulmifolia* Lam, *G. madruno* (Kunth) Hammel y hojas *C. cajan* (L.) Huth. Muestras acondicionadas, secadas en deshumecedor a 35°C por seis días, posteriormente pulverizadas. La ACIT fue sobre nauplios de *A. franciscana* 1500, 1000, 500, 50, 10 ppm; obteniéndose CL₅₀ vía Probit. La AAI *in vitro* 0,2 mL albúmina de huevo, 2,8 mL buffer fosfato y 2 mL de concentraciones de muestras, siendo concentraciones finales 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 ug/mL, absorbancia 660nm e IC₅₀ por curva dosis-respuesta. La AAI *in vivo* por edema plantar en ratón inducido por formol 10%, extractos vía oral 125mg/kg y 250mg/kg vs Diclofenaco 10mg/kg. Los resultados obtenidos *G. ulmifolia* Lam CL₅₀=9,12ppm; *G. madruno* (Kunth) Hammel CL₅₀=2,14ppm, *C. cajan* (L.) Huth CL₅₀=1,52ppm. La AAI *in vitro* *G. macrophylla* Mart. IC₅₀=399,29 ug/mL; *V. pseudolea* Rusby IC₅₀=321,21 ug/mL, *R. pedunculata* (H. Karst.) Flueck IC₅₀=319,97 ug/mL. La AAI *in vivo* *G. macrophylla* Mart. presentó mejor AAI a 125 mg/kg con 29,99% inflamación vs Diclofenaco 32,00%; *V. pseudolea* Rusby 32,23% inflamación vs Diclofenaco 29,49%; *R. pedunculata* (H. Karst.) Flueck 43,30% inflamación vs Diclofenaco 26,81%. Se concluye que las especies en estudio presentan ACIT y AAI.

Palabras claves: Actividad citotóxica, Actividad antiinflamatoria. Metabolitos secundarios

ABSTRACT

The objective was to establish secondary metabolites, cytotoxic activity and anti-inflammatory of six plant species: barks from *V. pseudolea* Rusby, *G. macrophylla* Mart., *R. pedunculata* (H. Karst.) Flueck, *G. ulmifolia* Lam, *G. madruno* (Kunth) Hammel and leaves from *C. cajan* (L.) Huth. The samples were conditioned, dried in a dehumidifier at 35°C for six days, and subsequently in powder. The ACIT was about nauplii of *A. franciscana* 1500, 1000, 500, 50, 10 ppm; obtaining CL₅₀ via Probit. The AAI *in vitro* 0.2mL of egg albumin, 2.8mL of phosphate-buffered-saline and 2mL of samples concentrations, being the final concentrations 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 ug/mL, absorbance 660nm and IC₅₀ by dose-response curve. The AAI *in vivo* by plantar edema in mice induced for 10% formalin, were extracted orally 125mg/kg and 250mg/kg vs Diclofenac 10mg/kg. The obtained results *G. ulmifolia* Lam CL₅₀=9.12ppm; *G. madruno* (Kunth) Hammel CL₅₀=2.14ppm, *C. cajan* (L.) Huth CL₅₀=1.52ppm. The AAI *in vitro* *G. macrophylla* Mart. IC₅₀=399.29 ug/mL; *V. pseudolea* Rusby IC₅₀=321.21 ug/mL, *R. pedunculata* (H. Karst.) Flueck IC₅₀=319.97 ug/mL. The AAI *in vivo* *G. macrophylla* Mart. presented the best AAI to 125 mg/kg with 29.99% of inflammation vs Diclofenac 32.00%; *V. pseudolea* Rusby 32.23% of inflammation vs Diclofenac 29.49%; *R. pedunculata* (H. Karst.) Flueck 43.30% of inflammation vs Diclofenac 26.81%. It concludes that the species in the study present ACIT and AAI.

Key words: Anti-inflammatory activity, cytotoxic activity, secondary metabolites

INTRODUCCIÓN

En el Perú existen alrededor de 4440 especies vegetales potencialmente útiles según estudios etnobotánicos, los cuales indican que 1080 especies son utilizadas en la Amazonía para tratar diferentes enfermedades ¹.

Los productos naturales derivados de plantas medicinales, continúan en aumento y anualmente ingresan a los mercados nuevos productos, generando preocupación en torno a la seguridad de la salud; esto se debe a que muchos de estos remedios naturales con potenciales efectos beneficiosos, aún no han sido probados y su uso no está controlado. Esto hace que el conocimiento de sus potenciales efectos adversos sea limitado y la identificación de terapias seguras y eficaces, así como la promoción de su uso racional sea difícil ².

El estudio y la investigación de los metabolitos secundarios ayudan a comprender la bioquímica y fisiología de los organismos que los producen y su mejor aprovechamiento con fines farmacológicos ³.

La importancia en el estudio de plantas medicinales de la Amazonía Peruana, radica en la forma en que éstas son utilizadas, qué parte es empleada y lo más importante cual es la finalidad de su uso; además del gran potencial para nuevos y mayores mercados nacionales y mundiales.

En la actualidad, el poblador amazónico sigue dando crédito al uso de vegetales con propiedades bondadosas en el tratamiento de diversas enfermedades, muchas veces con resultados positivos, aunque con base científica muy deficiente. Por tal motivo nace el interés de generar nuevos conocimientos con base científica, acerca de la actividad citotóxica y antiinflamatoria que poseen algunos vegetales procedentes de la Amazonía y que son muy usadas por los pobladores, como lo son: *Vitex pseudolea* Rusby, *Garcinia macrophylla* Mart, *Garcinia madruno* (Kunth) Hammel, *Cajanus cajan* (L.) *Remijia pedunculata* (H. Karst.) Flueck y *Guazuma ulmifolia* Lam.

Los beneficios que aportan los extractos e infusiones de diferentes partes de las plantas a las poblaciones indígenas y comunidades rurales, vienen siendo evaluadas en diversos ensayos *in vitro* e *in vivo*; éstos estudios experimentales apertura un campo para el tratamiento terapéutico en la medicina complementaria, aprovechando sus propiedades estimulantes que actúan como: antidiarréicos, antiinflamatorias, anticancerígenas, antidiabéticas, etc.; teniendo como referencia, la riqueza de metabolitos secundarios bioactivos útiles para el tratamiento de diversas patologías ⁴.

En ese sentido, debido al interés en el uso de las plantas medicinales como fuente de sustancias activas frente a procesos antiinflamatorios y de citotoxicidad, la presente investigación planteó como objetivo determinar los metabolitos secundarios, actividad citotóxica *in vitro* y actividad antiinflamatoria *in vitro* e *in vivo* de las especies en estudio, orientándose en la búsqueda de nuevas alternativas etnofarmacológicas procedentes de las diferentes especies vegetales materia de estudio como una alternativa para el aprovechamiento y cultivo sostenible de estos vegetales.

CAPITULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Goncalves R. *et al* - Brasil (2017), investigaron la composición química y la actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas de *Vitex agnus-castus* (VAC-EO) recolectadas en el norte de Brasil contra un panel representativo de bacterias cariogénicas. Utilizaron como técnica para la actividad antimicrobiana el método de microdilución en caldo en microplacas de 96 pocillos, cuyos valores lo expresaron en términos de concentración inhibitoria mínima (CIM), e identificaron mediante cromatografía de gases (GC-FID) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) los componentes químicos de VAC-EO. Concluyeron que VAC-EO mostró cierta actividad antimicrobiana contra todos los patógenos orales investigados: *Streptococcus mutans* (CIM = 15,6 µg / mL), *Lactobacillus casei* (CIM= 15,6 µg / mL) y *Streptococcus mitis* (CIM= 31,2 µg / mL); los compuestos 1,8-cineol (23,8%), (E) -β-farneseno (14,6%), (E) -cariofileno (12,5%), sabineno (11,4%) y acetato de α-terpinilo (7,7%) fueron los principales componentes químicos.⁵

Andres, M - México (2016), estudió a partir de hojas frescas de *Guazuma ulmifolia* (Malvaceae) la composición química del aceite esencial. Utilizó como técnica destilación por arrastre de vapor de donde obtuvo el aceite esencial y su determinación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM); comparando así los índices de retención, los espectros de masas y los datos reportados en la literatura. Concluyó que el aceite esencial presentó un rendimiento del 0,028% y de la misma se identificaron 38 compuestos los cuales constituyen el 67,2% de la composición total; siendo el b-citronelol (12,70%) y cariofileno (11,86%) los compuestos mayoritarios.⁶

Carrillo, L *et al* - España (2016), determinaron el perfil de metabólico secundario de la planta de *Garcinia madruno*, la relación estructura-actividad (SAR) y sus propiedades antioxidantes. El estudio fue de enfoque mixto, utilizaron como técnica el mecanismo de transferencia de electrones individuales (SET) y el mecanismo de transferencia de electrones de pérdida de protones (SPLET). Identificaron un total de 21 biflavonoides y 3 ácidos

orgánicos. Las hojas fueron la fuente más prometedora de biflavonoides y el epicarpio fue la fuente más rica de biflavonoides de tipo lloflavona (> 10%) seguido de otros bioflavonoides: Morelloflavone y fukugiside los mismos que fueron encontrados en todas las muestras como los compuestos responsables de la actividad antioxidante. Concluyeron que *G. madruno* contiene cantidades potencialmente útiles de biflavonoides bioactivos, de modo particular en las hojas y el epicarpio; siendo éstos una fuente potencial de productos funcionales.⁷

Ramírez, H. *et al.* – México (2015), evaluaron el rendimiento, la actividad antifúngica y antibacteriana de péptidos y metabolitos de las hojas de guácima (*Guazuma ulmifolia*). Los péptidos fueron extraídos con los buffers: B1 (pH 7,0) KCl, EDTA; B2 (pH 5.2) KCl, CH₃COONa, β-mercaptoetanol; B3 (pH 7,0) KCl, EDTA, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), polivinilpirrolidona, tiourea, mientras que los metabolitos fueron extraídos con hexano, metanol y diclorometano. La concentración de péptidos se realizó mediante el método de Bradford y su peso molecular se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida. Aplicaron cromatografía de capa fina (TLC)-columna empacada para separar los compuestos y analizarlos. La actividad antifúngica se midió por inhibición del desarrollo micelial *in vitro*, mientras que la antibacteriana fue evaluada por la formación de colonias (UFC mL⁻¹). Buffer 2 (B2) mostró el mayor valor (15,7%) en los rendimientos de extractos, en tanto que, los de hexano (3,9%), metanol (3,0%) y diclorometano (2,2%) fueron inferiores en este parámetro. El peso molecular aproximado de los péptidos fue de 24,9 kDa. Asimismo, el extracto con diclorometano fue el de mayor inhibición sobre *Sclerotium* (88,4%), B2 sobre *Xantomonas* (86,5%), y los extractos en hexano sobre *Xantomonas* (84,0%).⁸

Osorio, E. *et al.* – Colombia (2013), evaluaron la actividad antioxidante de los biflavonoides frente a la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) inducida con Cu²⁺. Utilizaron como método el ensayo TBARS. Aislaron seis biflavonoides de *G. madruno*, uno de los cuales, 7'' - O- (6'' - acetil) - glucósido de morelloflavona, es un nuevo compuesto identificado sobre la base de 1D, 2D NMR (HMQC y HMBC) métodos espectroscópicos y evidencia

química. Concluyeron que los flavanona- (3→8") - biflavonoides de flavona mostraron actividad antioxidante, la misma que fue significativamente más potente que la quercetina con un CE_{50} de 12,36 $\mu\text{g} / \text{ml}$ y la peroxidación de lípidos también se redujo significativamente en presencia de BF ($CE_{50}= 11,85 \mu\text{g} / \text{ml}$).⁹

Hoyos, T. – Cajamarca (2014), determinó la concentración de taninos en las hojas, corteza y frutos de la especie de *Guazuma ulmifolia*, donde la presencia de taninos en corteza fue 0,0073%, en frutos fue 0,0066% y de hojas fue 0,0023%. Concluyó que el extractivo con el que se obtuvo la mayor cantidad de residuos tánicos fue con el sulfito de sodio al 2%.¹⁰

Quintanilla, J. – Tingo María (2012), cuantificó el contenido de polifenoles y quercetina y evaluó la actividad antioxidante en dos especies nativas *Cajanus cajan* L. (frijol palo) y *Phaseolus vulgaris* L. (chaucha) que forman parte de la dieta alimenticia de los lugareños. La cuantificación de polifenoles fue por el método de Folin-Ciocalteu, el contenido de quercetina lo determinó por el método descrito por Tokusoglu y la actividad antioxidante fue por inhibición de DPPH y los radicales peroxilo por el método ABTS; obteniéndose para el contenido de polifenoles (GAE mg/100g): cáscara de chaucha 2747,8±52,84, cáscara de frijol palo 54,725±0,18, el cotiledón de chaucha 24,176±0,74, cotiledón de frijol palo 38,492±0,50; concentración de quercetina (mg/mL): cáscara de frijol chaucha 159,67±9,0, cáscara de frijol palo 4,291±0,34, el cotiledón de frijol chaucha 2,711±0,21 y el cotiledón de frijol palo 2,087±0,15. El IC_{50} (mg/mL) para inhibición de DPPH: cáscara de frijol chaucha 0,032, cáscara de frijol palo 6,28±0,1, cotiledón de frijol chaucha 20,64±0,14 y cotiledón de frijol palo 21,63±0,26 respectivamente. El IC_{50} (mg/mL) para inhibición de peroxilo cáscara de frijol: chaucha 0,0078, cáscara de frijol palo 0,891 ±0,1, el cotiledón de frijol chaucha 1,890±0,02 y cotiledón de frijol palo 1,642±0,02 respectivamente.¹¹

1.2 Bases teóricas

1.2.1 Análisis químico espectrofotométrico

El análisis químico es un conjunto de técnicas y procedimientos empleados para identificar y cuantificar la composición química de una sustancia. Se divide en dos partes: análisis cualitativo y análisis cuantitativo. Mediante el análisis cualitativo se identifican los elementos (o iones) que componen la sustancia estudiada; mientras que el análisis cuantitativo consiste en determinar la composición cuantitativa de elementos, iones o combinaciones químicas que forman parte de las sustancias examinadas.¹²

En ese sentido, en los últimos años, es imprescindible destacar la importancia de poder identificar, cuantificar cada uno de los metabolitos secundarios presentes en las especies medicinales; ya que se ha demostrado que existe una gran variación en cuanto a la concentración de estos metabolitos en la planta.

Hoy en día, dentro de las técnicas analíticas frecuentemente usadas para la cuantificación de metabolitos secundarios se encuentra la espectrofotometría de absorción, la cual se fundamenta en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y, a su vez, la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración, cumpliendo con la ley de Lambert y Beer. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro de absorción, en el que se selecciona la longitud de onda de máxima absorción de la solución y luego se mide la cantidad de luz absorbida por la misma a diferentes concentraciones. Estos métodos consisten básicamente en hacer reaccionar los metabolitos secundarios con reactantes que generen productos coloreados que puedan ser medidos por espectrofotometría en la región visible del espectro electromagnético.¹³

1.2.2 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios producto de las reacciones fitoquímicas de angiospermas son compuestos de naturaleza química diversa¹⁴. Los

Metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también, una síntesis activa de Metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como:

- a) El consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados).
- b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos.
- c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas; y,
- d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico

Algunos de estos productos tienen funciones ecológicas específicas como, atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas. Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales.¹⁴

Es importante destacar que los metabolitos secundarios también reciben la denominación de productos naturales, porque tienen un importante y significativo valor medicinal, de uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica.

En la actualidad se conocen aproximadamente 20,000 estructuras que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los Metabolitos secundarios que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no protéicos, aminas, glucósidos

cianogénicos y glucosinolatos. Los Metabolitos secundarios no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides.¹⁵

Clasificación de los metabolitos secundarios:

Saponinas: son compuestos bioactivos encontrados principalmente en plantas, pero también en algunos organismos marinos e insectos. De acuerdo al carácter químico de la aglicona (conocido como sapogenina) las saponinas se dividen en esteroides y triterpenoides. Los esteroides predominan en las plantas y son compuestos que tienen 27 átomos de carbono que conforman la estructura central (spirostanol y furostanol). Por su parte las triterpenoides están compuestas principalmente por agliconas con 30 átomos de carbono (Oleanano).¹⁶

Los tipos de saponinas más encontradas son las triterpenoides especialmente en leguminosas, sin embargo se puede encontrar una gran variedad de estos compuestos con diferentes propiedades biológicas dependiendo de la modificación en la estructura de su anillo y el número de azúcares adheridos.¹⁷

Fenólicos: también llamados polifenoles, son un tipo de metabolitos secundarios encontrados en la mayoría de las plantas. Presentan limitada solubilidad y estabilidad frente a parámetros como pH, temperatura, presencia de oxígeno, metales entre otros. Se clasifican en varias categorías dentro de las que se incluyen antocianidinas, flavonoles, flavanoles (catequinas y proantocianidinas), flavanones, flavones e isoflavonas.¹⁸

a) Flavonoides: son compuestos polifenólicos que comprenden quince átomos de carbono, con dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos. Son los compuestos fenólicos más numerosos y se encuentran en todo el reino vegetal, están presentes en altas concentraciones en la epidermis de las hojas y cascaras de las frutas. Estos compuestos juegan un papel importante como metabolitos secundarios.

Las principales clases de flavonoides son: 1) flavonas (estructuras básicas) por ejemplo: luteolina, la apigenina, diosmetina, crisoeriol,

tangeretina, sinensetina, gardenin, vitexina y baicaleína; 2) flavonoles (que tiene un grupo hidroxilo en la posición 3) por ejemplo: kaempferol, quercetina, galangina, datiscetina, morin, robinetina isorhamnetina, tamarixetina, quercetagetina y miricetina; 3) flavanonas (enlaces saturados en las posiciones 2-3) por ejemplo: hesperetina, taxifolina, eriodictiol y naringenina; 4) flavan-3-ol por ejemplo: catequina y epicatequina; 5) isoflavonas por ejemplo: genisteína, daidzeína y coumestrol; 6) antocianidinas: cianidina, delphinidina, pelargonidina y peonidina. La mayoría de los flavonoides se encuentran comúnmente conjugados con azúcares en forma de glucósidos, también es común encontrar grupos hidroxilo en las posiciones 4, 5 y 7.¹⁸

- b) Antocianinas: son pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos. Son antioxidantes pertenecientes al amplio grupo de los flavonoides. Representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano.¹⁹ Estos pigmentos son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul en varias frutas, vegetales y cereales, acumulados en las vacuolas de la célula. Las antocianinas poseen diferentes funciones en la planta como son la atracción de polinizadores para la posterior dispersión de semillas y la protección de la planta contra los efectos de la radiación ultravioleta y contra la contaminación viral y microbiana. El interés por los pigmentos antociánicos e investigación científica se han incrementado en los últimos años, debido no solamente al color que confieren a los productos que las contienen sino a su probable papel en la reducción de las enfermedades coronarias, cáncer, diabetes; a sus efectos antiinflamatorios y mejoramiento de la agudeza visual y comportamiento cognitivo. Por lo tanto, además de su papel funcional como colorantes, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano. A pesar de las ventajas que ofrecen las antocianinas como sustitutos potenciales de los colorantes artificiales, factores como su baja

estabilidad y la falta de disponibilidad de material vegetal limitan su aplicación comercial.²⁰

- c) Catequinas: Poseen actividad antiinflamatoria, su presencia contribuye a una mejor conservación de los antocianos. Se localizan en semilla y hollejos en formas simples o polimerizadas, los polímeros de catequinas se denominan oligómeros procianidólicos, proantocianidoles o taninos catéquicos.²¹
- d) Proantocianidoles: Son llamadas colectivamente proantocianidina oligomérica. Pueden ser absorbidos por las membranas celulares y protegerlas de radicales libres. Tiene la ventaja de ser lipo e hidrosoluble.²¹

Alcaloides: son compuestos heterocíclicos que generalmente se sintetizan a partir de aminoácidos, tales como triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina, solos o combinados con terpenoides. También se pueden derivar de purinas y del acetato de los policétidos. Los alcaloides se pueden dividir en los siguientes grupos: alcaloides isoquinoléicos, alcaloides quinolizidínicos, alcaloides pirrolizidínicos, alcaloides tropánicos y alcaloides indólicos ⁽¹⁵⁾. Por su similitud química a moléculas que participan en la transmisión de las señales del sistema nervioso, el efecto tóxico de los alcaloides radica en su capacidad de bloquear neuroreceptores, intermediarios de la transducción de la señal neuronal y canales iónicos de vertebrados e insectos. Mientras que sus efectos inhibitorios del crecimiento de microorganismos patógenos están dados por su capacidad de intercalarse con el DNA, de detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos.²²

1.2.3 Actividad citotóxica

Citotoxicidad, es la capacidad que tienen ciertas sustancias de destruir o lesionar las células tisulares. Todas las sustancias con efectos tóxicos, por variados que éstas sean, son compuestos químicos complejos que provocan enfermedades, o en casos muy graves, ocasionan la muerte según la dosis ingerida. Entre las sustancias tóxicas que contienen

muchas plantas se encuentran alcaloides, glicósidos cardiotónicos, saponinas y terpenoides.²³

Los ensayos de citotoxicidad *in vitro*, son empleados porque son fácilmente cuantificables y reproducibles, determinan el potencial citotoxicidad de los compuestos estudiados, porque ellos van a ser usados como fármacos, cosméticos y deben demostrar que no son tóxicos.²⁴

En la última década, se han incorporado algunos ensayos de gran utilidad y eficacia que requieren pequeñas cantidades de muestras y permiten la evaluación rápida de extractos crudos y fracciones, conduciendo con seguridad a los principios activos en donde un valor de CL₅₀ inferior a 1000 ug / mL se considera bioactivo y sentido puede tener actividad biológica.²⁵

Un lugar sobresaliente dentro del grupo de bioensayos más utilizados lo ocupa el ensayo de *Artemia spp.* Este es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los materiales en larvas de *Artemia spp.*, y de esta manera se predice su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos, como uno de los indicadores de actividad antitumoral inicial.^{26,27}

1.2.4 Actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria es la capacidad que tienen algunas especies vegetales de reducir inflamación y ésta ha despertado en los últimos años un gran interés científico en el área farmacológica, principalmente en virtud de la capacidad potencial de ciertos compuestos de interferir en la evolución de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios.

El conocimiento de los constituyentes químicos presentes en las plantas que son consideradas medicinales, pero cultivadas en regiones geográficamente y con condiciones ambientales distintas es muy

importante, ya que nos permitirá comparar los grupos fitoquímicos presentes y las actividades antiinflamatorias de sus extractos, para de esta manera validarlo de forma científica; ya que los productos naturales son de gran potencial farmacológico debido a su amplia diversidad estructural y su excelente adaptabilidad a estructuras biológicamente activas.²⁸

1.2.5 Especies vegetales en estudio

1.2.5.1 Familia Fabaceae

La familia Fabaceae de distribución cosmopolita, es la familia botánica de las plantas generalmente con legumbre, y su importancia es fundamental en la economía de la naturaleza. Comprende 600 géneros, divididos en tres subfamilias, con 12000 a 17000 especies. Pueden ser árboles, arbustos (inermes o espinosos), sufrútices o hierbas, perennes o anuales, trepadoras, de tallo voluble o con zarcillos. El sistema radical es primario (pivote), generalmente con nudosidades debidas a la simbiosis que presentan con las bacterias del género *Rhizobium*, que asimilan el nitrógeno atmosférico. Las flores son vistosas, usualmente de colores amarillos, violetas y rojos; agrupados en inflorescencias que responden casi siempre al tipo racimoso de floración centrípeta. Las hojas son casi siempre alternas y con estípulas, persistentes o caedizas, por lo general compuestas pinadas o bipinadas, o digitadas o trifolioladas. Fruto típicamente legumbre o vaina dehiscente, seca, bivalva; o bien una legumbre modificada hacia sámara, lomento, utrículo, drupa o cripto-lomento. La utilidad de las leguminosas abarca muchos campos. Se las utiliza como alimenticias, forrajeras, oleaginosas, cultivo de abono verde, forestales, textiles, insecticidas, medicinales, ornamentales, etc.²⁹

1.2.5.1.1 Clasificación taxonómica de *Cajanus cajan* (L.) Huth “puspo poroto”

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida

Orden : Fabales
Familia : Fabaceae
Género : Cajanus
Especie : *Cajanus cajan* (L.) Huth

Descripción Botánica

Arbusto perenne de hasta 4 m de alto. Los tallos son acostillados cuando son jóvenes, leñosos y rollizos con la edad. En la base de las hojas sobre el tallo generalmente se presenta un par de hojillas (llamadas estípulas) angostamente triangulares, de hasta 6 mm de largo; las hojas alternas, compuestas de 3 hojitas (llamadas foliolos), las 2 laterales asimétricas elípticas, de hasta 12 cm de largo y hasta 4.5 cm de ancho, la terminal elíptica, ovadoelípticas a angostamente ovadas, de hasta 13 cm de largo y hasta 5.5 cm de ancho, más o menos puntiagudas, angostadas hacia la base, con puntos glandulares sobre su superficie; en la base de cada foliolo se presenta un par de estipelas muy angostas de hasta 4 mm de largo; los pecíolos de hasta 8 cm de largo. Presenta numerosas flores pediceladas (los pedicelos de hasta 15 mm de largo) dispuestas en inflorescencias racemosas pedunculadas (los pedúnculos de hasta 8 cm de largo). Cada flor acompañada de una bráctea pequeña de hasta 4 mm de largo. El cáliz de la flor está cubierto de pelillos, es un tubo acampanado de hasta 6 mm de largo, que hacia el ápice se divide en 5 lóbulos triangulares de hasta 7 mm de largo; la corona es de color amarillo pálido a intenso (frecuentemente con rayas cafés), de 5 pétalos desiguales, el más externo es el más ancho y vistoso, llamado estandarte (de forma casi circular, de hasta 22 mm de largo y 20 cm de ancho), enseguida se ubica un par de pétalos laterales similares entre sí llamados alas (de hasta 20 mm de largo y hasta 7 mm de ancho) y por último los dos más internos, también similares entre sí y generalmente fusionados forman la quilla (de hasta 17 mm de largo y hasta 7 mm de ancho, de color algo verdoso) que envuelve a los estambres y al ovario; tiene 10 estambres, los filamentos de 9 de ellos están unidos formando un tubo y 1 libre; el ovario es angosto, de hasta 8 mm de largo, cubierto de abundantes pelillos y de puntos glandulares, con

1 estilo delgado, de hasta 12 mm de largo y curvado hacia la punta. Puzpo poroto son legumbres oblongas, de hasta 13 cm de largo y hasta 1.7 cm de ancho, rectos o algo curvados, comprimidos, deprimidos entre las semillas, claramente puntiagudos, de color pajizo y frecuentemente con rayas moradas, generalmente cubiertos de pelillos, con 2 a 9 semillas.³⁰

Distribución original

La India, Afganistán, Bangladesh, Bután, Sri Lanka, Etiopía, Kenia, Malawi, Tanzania y Uganda.³⁰

1.2.5.2 Familia Clusiaceae

Se trata de una familia formada por árboles, arbustos y raras veces hierbas. Sus miembros presentan hojas opuestas o verticiladas, simples, a menudo engrosadas, generalmente verdes, y sin estípulas. Tanto hojas como tallo y otras piezas están provistas de glándulas aceitosas. Flores regulares, bisexuales o unisexuales en plantas separadas; solitarias o en inflorescencias cimosas. Tienen entre 2-14 sépalos, 2-14 pétalos y numerosos estambres libres o ligeramente unidos en la base o en 2-5 haces. Fruto bacciforme, drupáceo o capsular, con semillas a veces aladas.

1.2.5.2.1 Clasificación taxonómica de *Garcinia madruno* (Kunth) Hammel “charichuelo chico”

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Equisetopsida
Orden	:	Malpighiales
Familia	:	Clusiaceae
Género	:	<i>Garcinia</i>
Especie	:	<i>Garcinia madruno</i> (Kunth) Hammel

Descripción Botánica

Es un árbol dioico, de tamaño mediano, que alcanza de 10 a 15 m de altura,

tronco recto, corteza grisácea, copa simétrica. Hojas opuestas, de colores verde oscuro, elípticos a oblongas, de 5 a 20 cm de largo y de 0.5 a 6 cm de ancho, que contienen un látex amarillo. Flores amarillentas, en grupos de 1 a 15 en los nudos de las ramas. Fruta esférica, ovoide o elipsoide, de 5 a 10 cm de largo, con cáscara gruesa, amarilla y cubierta de protuberancias; pulpa blanca, aromática, jugosa, de sabor agridulce, y que contiene de 1 a 3 semillas.³¹

La fruta se consume principalmente al natural, también se utiliza en la elaboración de jaleas y jugos. Es un árbol vistoso, resistente a plagas y enfermedades y adaptable a diferentes condiciones ambientales. Estas cualidades, también lo hacen ideal como árbol ornamental. *G. madruno* está relacionado con el mangostán (*G. mangostana*) y con especies americanas de *Garcinia*, como *G. macrophylla*, *G. brasiliensis* y *G. magnifolia* (a la que también se la llama madroño). No se conocen variedades; sin embargo, existe variabilidad en características de interés, como por ejemplo, el tamaño y la calidad de la fruta, y la productividad de los árboles, entre otras. *G. madruno* también es conocido como *Rheedia madruno*, *R. acuminata* y *Calophyllum madruno*. En el pasado, se consideraba que el género *Garcinia* existía en el Viejo Mundo y *Rheedia* en el Nuevo, pero hoy está aceptado que no hay una distinción taxonómica verdadera, y todas se ubican en el género *Garcinia*.³¹

Distribución original

Presenta una distribución restringida a Costa Rica, Panamá y el norte de Sudamérica. En Colombia, es conocida tradicionalmente como madroño.³¹

1.2.5.2.2 Clasificación taxonómica de *Garcinia macrophylla* Mart. “charichuelo grande”

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Equisetopsida
Orden	:	Malpighiales
Familia	:	Clusiaceae

Género : Garcinia
Especie : *Garcinia macrophylla* Mart.

Descripción Botánica

El bacuripari es sobresaliente porque crece y produce una cosecha significativa en condiciones de sombra. Los árboles también toleran la exposición total al sol y al viento, lo que los hace más adaptables a climas variados que el mangostán. Existe una considerable variación en la calidad de la fruta entre bacuripari de diferentes regiones de Sudamérica, y puede haber diferentes especies involucradas. La fruta no es muy apreciada, pero se come y se vende ampliamente en los mercados nativos. El bacuripari se introdujo en Florida en 1962 y se sembró en el Centro de Investigación y Educación Agrícola en Homestead, en Fairchild Tropical Garden y en varios jardines privados. Un árbol fructificado en 1970, otro en 1972, y el segundo ha continuado soportando.

Las hojas son hojas rígidas, coriáceas, lanceoladas oblongas o lanceoladas anchas, de 12 a 18 pulgadas (30-45 cm) de largo y de 3 a 7 pulgadas (8-18 cm) de ancho, puntiagudas en ambos extremos, con numerosos laterales, casi horizontales venas. El nuevo follaje es granate.

Las flores masculinas y femeninas de 4 pétalos se encuentran en pequeños racimos axilares en árboles separados, el macho en tallos delicados de 1 1/2 pulgada (4 cm) de largo y tiene numerosos estambres, la hembra en tallos gruesos y cortos y algunas veces con unos pocos estambres con anteras estériles. En Florida, las flores aparecen en abril y mayo y una segunda vez en agosto y septiembre.

Los frutos son de forma variable, con un promedio de 4 a 5 cm de diámetro y 5 a 6 cm de longitud. La fruta tiene una pared externa gruesa y dura que contiene un látex amargo, como en bacurí. Dentro de la cáscara dura hay una carne blanca y cremosa que rodea de 3 a 4 semillas grandes. La carne es escasa en comparación con el mangostán o bacurí.

Las frutas están en temporada de mayo a agosto y nuevamente en octubre y noviembre. Algunos árboles de entre 15 y 20 años han producido de 100 a 200 frutos cuando no ha habido condiciones climáticas adversas. Polinización,

es una especie dioica, tanto masculina como femenina, necesita ser cultivada si se requieren frutas y semillas.

Los árboles se propagan por semilla y pueden requerir de 7 a 10 años para entrar en producción. Las semillas han permanecido viables durante 2 a 3 semanas, pero requieren varias semanas para germinar.³²

Distribución original

Presenta distribución en Bolivia, Perú, Ecuador, México, Panamá y Venezuela.³²

1.2.5.3 Familia Rubiaceae

Familia amplísima, con 631 géneros y 10.700 especies. 9 géneros en Europa con especies silvestres o naturalizadas.

Subarbustos y plantas herbáceas, generalmente con tallos tetragonales y a menudo con acúleos o pelos en las partes vegetativas. Hojas opuestas o verticiladas, simples, enteras, generalmente denticuladas o serruladas, con estípulas generalmente foliares.

Inflorescencias cimosas. Flores hermafroditas o raramente unisexuales, actinomorfas. Cáliz con 4-6 sépalos soldados. Corola gamopétala con 4-6 pétalos poco coloreados. 4-6 estambres soldados al tubo de la corola. Gineceo con ovario ínfero con 2 carpelos, con 1 estilo bifurcado o 2 estilos libres. Fruto es un esquizocarpo o drupáceo.

1.2.5.3.1 Clasificación taxonómica de *Remijia pedunculata* (H. Karst.) Flueck

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Equisetopsida
Orden	:	Gentianales
Familia	:	Rubiaceae
Género	:	Remijia
Especie	:	<i>Remijia pedunculata</i> (H. Karst.) Flueck

Descripción Botánica

Presentan una importante longitud en los pedúnculos más largos que el mismo eje de la parte florecida, tienen estípulas romas o panduriformes muy permanentes y estríado-digitadas, estípulas casi iguales en cuanto al contorno, frutos globosos, estríados de la base hacia el ápice.

Distribución original

Presenta distribución en Colombia, Ecuador, Venezuela, Perú.³³

1.2.5.4 Familia Malvaceae

Esta familia cuenta con 121 géneros y 1550 especies, 14 géneros (4 de ellos introducidos) con especies silvestres o naturalizadas en Europa.

Son Plantas herbáceas o subarbustos. Hojas alternas, lobuladas, con estípulas. Inflorescencias axilares o flores solitarias. Flores hermafroditas, actinomorfas, con epicáliz de 2-9 peces que pueden estar soldados o libres. Cáliz con 5 sépalos soldados. Corola con 5 pétalos libres o un poco soldados en la base, rosados, violáceos o blanquecinos. Muchos estambres unidos por los filamentos formando una columna central. Gineceo con ovario súpero, con muchos carpelos y muchos estilos. Fruto en esquizocarpo.

1.2.5.4.1 Clasificación taxonómica de *Guazuma ulmifolia* Lam

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Equisetopsida
Orden	:	Malvales
Familia	:	Malvaceae
Género	:	Guazuma Mill.
Especie	:	<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam

Descripción Botánica

Es un árbol de porte pequeño a mediano y puede alcanzar hasta 15 m de altura. La copa es redonda y extendida. Su tronco es torcido y ramificado, con

hojas simples, alternas, ovaladas a lanceoladas. Sus flores pequeñas y amarillas se agrupan en panículas en la base de las hojas. Sus frutos son cápsulas verrugosas y elípticas, negras cuando están maduras, con numerosas semillas pequeñas y duras. Crece bien en zonas cálidas con temperaturas promedios de 24°C, de 700 a 1500 mm de precipitación/año y desde el nivel del mar a los 1200 msnm. Se da en suelos de texturas livianas y pesadas, con buen drenaje, no pedregosos y pH superior a 5.5. El Caulote es un árbol que tiene una gran variedad de usos. Produce leña de alta calidad, carbón y forraje, así como madera para carpintería general y construcción rural. Es un árbol importante en sistemas silvopastoriles ya que el forraje y los frutos son altamente nutritivos y apetecidos por el ganado. La madera tiene un amplio rango de usos: es ligera (0.45 - 0.60), fácil de trabajar y se puede usar para construcción rural, muebles, duelas de barril, cajas y embalaje, mangos de herramientas, hormas para zapato, y carbón para la fabricación de pólvora. También se usa para postes de cerca y construcciones rurales, pero no es duradera y necesita tratamiento químico si se usa para cercas. Es particularmente susceptible a termitas.

Su uso más extendido en América Central es para leña, la cual es de excelente calidad, fácil de rajarse y secarse; quema bien, con buenas brasas, bastante calor y poco humo. Se comercializa en muchos lugares.

La hoja es lanceolada, 2 - 16 cm de largo, con borde serrado. El haz es liso y verde oscuro, el envés verde pálido y veloso, con venas abultadas. Los grupos de pequeñas flores amarillas se agrupan en panículas de hasta 3 cm de largo. Los frutos son cápsulas redondas, de 1.6 - 2.4 cm de largo, muy verrugosas. Oscurecen y endurecen al madurar, y se abren regularmente por muchos poros pequeños, aunque sin liberar la semilla. Dentro hay cinco celdas con numerosas semillas blancas de 3 mm envueltas en una pulpa dulce.

Se reportan ataques de larvas de insectos en los frutos. Las plantas jóvenes son atacadas por un escarabajo cerambícido (*Cerambix* sp) que anilla y corta la madera de tallos y ramas de hasta 3 cm de diámetro. Las hojas son atacadas por áfidos.³⁴

Distribución original

Presenta distribución en Argentina, Bolivia, Brasil, Caribe, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Venezuela, Perú, EE.UU., Paraguay.^{34,35}

1.2.5.5 Familia Lamiaceae

Familia cosmopolita y amplia, con 224 géneros y 5600 especies, 41 géneros con especies silvestres en Europa. Arbustos y plantas herbáceas, a menudo con tallo tetragonal, generalmente aromáticas. Hojas opuestas, enteras o divididas. Inflorescencias cimosas. Flores hermafroditas, zigomorfas. Cáliz con 5 sépalos soldados. Corola con 5 pétalos, generalmente bilabiada. 2-4 estambres libres. Gineceo con ovario súpero de 2 carpelos, 1 estilo y 2 estigmas. Fruto en núcula.

1.2.5.5.1 Clasificación taxonómica de *Vitex pseudolea* Rusby

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Equisetopsida
Orden	:	Lamiales Bromhead
Familia	:	Lamiaceae
Género	:	<i>Vitex</i>
Especie	:	<i>Vitex pseudolea</i> Rusby

Descripción

Es una especie forestal con alto valor comercial, ampliamente utilizada en la región San Martín para trabajos de construcción de viviendas, cercos ganaderos, muebles, etc.³⁶

Distribución original

Presenta distribución en Bolivia, Perú.³⁶

1.3 Definición de términos básicos

- Instant Ocean: conocida como sal marina, cuidadosamente formulada para crear el ambiente marino ideal.
- Nauplio: también llamada larva, es la primera larva característica de los crustáceos.
- Metabolitos secundarios: producto de las reacciones fitoquímicas de angiospermas; son compuestos de naturaleza química diversa.
- Actividad citotóxica: es la capacidad que tienen ciertas sustancias de destruir o lesionar las células tisulares.
- Actividad antiinflamatoria: es la capacidad que tienen algunas especies vegetales de reducir inflamación, principalmente en virtud de la capacidad potencial de ciertos compuestos de interferir en la evolución de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios.

CAPITULO II: VARIABLES E HIPÓTESIS

2.1 Variables y su operacionalización

Variable Independiente

Metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico.

Variables Dependientes

- Actividad citotóxica *in vitro* sobre *Artemia franciscana*.
- Actividad antiinflamatoria *in vitro* sobre albúmina de huevo.
- Actividad antiinflamatoria *in vivo* sobre edema plantar en ratón.

Variables y su operacionalización

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	INTRUMENTO
Independiente (X): Metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico	Producto con diversos compuestos químicos, obtenido por maceración, filtrado, evaporado (solvente) y llevado hasta sequedad, la misma que es evaluada experimentalmente.	Material vegetal seco micropulverizado a la cual se adiciona Alcohol – agua (7:3), sometida a maceración por 7 días, filtrado, concentrado en rota vapor a 40° C y a 40 rpm, la misma que se colocará en una estufa a 40°C hasta sequedad y luego refrigerado, hasta su posterior uso en los ensayos.	Metabolitos secundarios: Polifenoles totales, Flavonoides, Antocianinas, Catequinas, Alcaloides, Saponinas	mg/100g	Hoja de trabajo

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	INSTRUMENTO
Dependientes (Y ₁): Actividad citotóxica <i>in vitro</i> sobre <i>Artemia franciscana</i>	Ensayo donde se puede evaluar la citotoxicidad de un tratamiento, en términos de concentraciones letales (CL ₅₀).	Ensayos empleados para determinar la potencial citotoxicidad que presentan los extractos de las especies vegetales sobre los nauplios de <i>Artemia</i> spp., con la finalidad de conocer la concentración que producirá un efecto tóxico en el 50% de la especie en experimentación y visualizar la relación riesgo-beneficio que implicará el uso de estos extractos vegetales como alternativa medicinal.	Nivel de concentración letal (CL ₅₀).	ppm	Hoja de trabajo

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	INSTRUMENTO
Dependientes (Y ₂): Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> sobre albúmina de huevo.	Ensayo donde se puede evaluar la actividad antiinflamatoria de un tratamiento, en términos de porcentaje de inhibición antiinflamatoria e IC ₅₀ .	Ensayos empleados para determinar el potencial antiinflamatorio que presentan los extractos de las especies vegetales en estudio con la finalidad de conocer la concentración que producirá un porcentaje de inhibición antiinflamatoria satisfactoria e IC ₅₀ ; y así visualizar la relación riesgo-beneficio que implicará el uso de estos extractos vegetales como alternativa medicinal.	Porcentaje de inhibición IC ₅₀	%, mg/mL	Hoja de trabajo

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	INSTRUMENTO
Dependientes (Y ₃): Actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> sobre edema plantar en ratón.	Ensayo donde se puede evaluar la actividad antiinflamatoria de un tratamiento, en términos de porcentaje de inhibición antiinflamatoria e IC ₅₀ .	Ensayos empleados para determinar el potencial antiinflamatorio que presentan los extractos de las especies vegetales en estudio en ratones, con la finalidad de conocer la concentración que producirá un porcentaje de inhibición antiinflamatoria satisfactoria e IC ₅₀ ; y así visualizar la relación riesgo-beneficio que implicará el uso de estos extractos vegetales como alternativa medicinal.	Porcentaje de inhibición IC ₅₀	%, mg/mL	Hoja de trabajo

2.2 Formulación de la hipótesis

H₁: Alguno de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Vitex pseudolea* Rusby, *Garcinia macrophylla* Mart, *Garcinia madruno* (Kunth) Hammel, *Cajanus cajan* (L.) *Remijia pedunculata* (H. Karst.) Flueck y *Guazuma ulmifolia* Lam. presentan actividad citotóxica y antiinflamatoria.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de investigación

Tipo Cuantitativo, porque se recopiló y analizó los datos obtenidos de distintas fuentes con intervención del investigador, se controló deliberadamente las variables para delimitar relaciones entre ellas a fin de medir los resultados de manera concluyente.

Diseño de investigación experimental, debido a que la intervención es a propósito de la investigación y al mismo tiempo cumplió con la asignación aleatoria de un grupo control. El presente estudio estuvo conformado por cuatro ensayos experimentales, en el primer ensayo se determinó la actividad citotóxica *in vitro*, el segundo ensayo se determinó la actividad antiinflamatoria *in vitro*, el tercer ensayo se determinó la actividad antiinflamatoria *in vivo* y el cuarto ensayo se hizo el análisis químico a fin de determinar la cantidad de metabolitos secundarios presentes en las especies vegetales.

Ensayo 1: Actividad citotóxica *in vitro*: para este ensayo, se utilizó el método sobre *Artemia spp*, propuesto por (Anderson, Meyer, Thompson (Cytel, 1995).

Ensayo 2: Actividad antiinflamatorio *in vitro*: se utilizó el método de la albúmina de huevo, propuesto por Priyanka C. *et al.*, 2012.

Ensayo 3: Actividad antiinflamatorio *in vivo*: se utilizó el método de inducción de inflamación por formol al 10%, según protocolo del Instituto de Medicina Tradicional.

Ensayo 4: cuantificación de metabolitos secundarios: para este ensayo, se utilizaron las técnicas espectrofotométricas Génesis 10S UV/vis v4.006 y cromatográficas (TLC), para lo cual se utilizó extractos metanólicos y etanólicos de las seis especies vegetales en estudio. Se midieron polifenoles totales, flavonoides, antocianinas, catequinas y protocianolidoles, saponinas y alcaloides.

3.2 Población y muestra

Población: estuvo conformado por corteza de *Vitex pseudolea* Rusby, *Garcinia macrophylla* Mart., *Remijia pedunculata* (H. Karst.) Flueck,

Guazuma ulmifolia Lam, *Garcinia madruno* (Kunth) Hammel; hojas de *Cajanus cajan* (L.) Huth; especies vegetales colectadas del Jardín Botánico del IMET, comunidad de Tamshiyacu, Jenaro Herrera. Las muestras colectadas fueron secadas, pulverizadas y almacenadas en frascos de color ámbar a una temperatura ambiente hasta su uso en los diferentes ensayos.

Tipo de muestreo:

Fue por aleatorización obtenida a través de los datos etnobotánicos descritos, en la cual se eligió aquellas especies vegetales que contienen información sobre posibles actividades antiinflamatorias y citotóxicas.³⁷

Criterios de inclusión:

- Material vegetal identificado y georeferenciado.
- Material vegetal en buen estado de conservación.

3.3 Técnicas e instrumentos

La técnica de recolección de datos fue a través de la evaluación química a cada especie vegetal materia de estudio, donde se aplicó como instrumento metodologías de análisis químicos; contando para ello con reactivos, materiales de laboratorio, equipos de medición, programas estadísticos que procesaron los resultados de todas las especies vegetales en relación a su actividad citotóxica, antiinflamatoria.

Este trabajo de investigación se desarrolló en tres fases: revisión de bibliografía de fuentes, trabajo de campo, laboratorio y análisis de los resultados obtenidos.

La búsqueda y revisión bibliográfica proporcionó los conocimientos teóricos para la realización del trabajo.

3.4 Procedimiento de recolección de datos

A. Recolección de la muestra vegetal: Las muestras de las seis especies vegetales fueron recolectadas de la comunidad de Tamshiyacu, IMET, Jenaro Herrera.

Todas las muestras fueron llevadas al Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana – UNAP, donde el personal especialista identificó cada planta materia de estudio.

Preparación del pulverizado vegetal:

- Se utilizó las hojas y corteza.
- Se cortó en pequeños fragmentos.
- El secado se realizó con la ayuda de un equipo deshumecedor en ambiente con temperatura constante de 35 °C por seis días
- Una vez seca la muestra, se procedió a pulverizarlas.
- El pulverizado se guardó en frascos de vidrio ambar, para su posterior uso.

B. Preparación de extractos hidroalcoholico:

a) Con el material vegetal pulverizado, se preparó los extractos utilizando una solución hidroalcohólica 70:30 (Alcohol – agua), c.s.p cubrir la muestra, es decir: 50 g de material vegetal micropulverizado en 500 mL de la solución hidroalcohólica.

- Después, fue sometida a maceración por 7 días.
- Posteriormente, se filtró el extracto macerado con ayuda de una bomba al vacío. Se concentró con la ayuda del equipo rota vapor a 40° C y a 40 rpm.
- El extracto obtenido en el rota vapor, se colocó en una estufa a 40°C hasta sequedad y posteriormente fue refrigerado para su uso en los respectivos ensayos, según Anexo: Figura 1: Flujograma preparación de extractos Hidroalcohólicos (Etanólico)

C. Ensayo 1: Citotoxicidad

Preparación de la muestra

Certificación de la especie vegetal

El Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de Amazonia Peruana – UNAP certificó la especie vegetal y entregó una constancia con su respectivo código de identificación, según corresponde.

Animales de experimentación

Especie animal:

Quistes de *Artemia franciscana*, que luego de un proceso de eclosión se convirtieron a nauplios.

Condiciones de mantenimiento de los camarones de experimentación:

En un vaso precipitado de vidrio de 600mL, se preparó una solución de Instant Ocean 3% disolviendo 15 g de sal de IO (Instant Ocean) en 500 mL de agua destilada. De esta solución preparada, se extrajo 30 mL de solución IO 3%. Se agregaron 0.1g de quistes de *Artemia franciscana* y se dejó en reposo por un lapso de 15 minutos (proceso importante para poder descartar los quistes inviables). Luego, se agregó 370 mL de solución de IO para su hidratación a temperatura 25°C por 1 hora. Después, se colocó un pelele acuario (motor que es el encargado de dar aireación) en el vaso precipitado para la aireación (utilizar cinta adhesiva para fijar y cubrir con un papel de aluminio el recipiente), se colocó dos lámparas pequeñas de 20W a menos de 5 cm de cada lado del frasco para una iluminación uniforme. Incubación a temperatura 25°C por 48 horas.^{38,39}

Condiciones ambientales para los quistes de experimentación:

Serán monitoreados mediante un medidor de temperatura en el laboratorio entre 22 y 29° C, la iluminación es permanente con dos lámparas de 20W.

Tratamiento y evaluación de grupos experimentales:

Apagar el pelele y una de las lámparas de luz de manera que los nauplios se congregaron para el lado iluminado del vaso precipitado. Después, se etiquetó los tubos de ensayos; colocando 07 columnas de tubos de ensayos etiquetados: A, B, C, D, E, F y G respectivamente. Cada columna, tuvo tres filas de tubos. Tubos A1-A3, B1-B3, C1-C3, D1-D3 y E1-E3 contenían los nauplios con el extracto a evaluar (fueron los grupos experimentales). Los tubos de ensayos F1 – F3 fueron controles negativos con sólo el nauplio y solución IO agregada; los tubos de ensayos G1 – G3 fueron controles positivos en el que se añadieron 400 ppm de K₂Cr₂O₇.

Luego, se preparó la solución madre de extracto a evaluar en una concentración de 2000 ppm, siendo un extracto esterilizado purificado; se preparó a partir de ella, nuevas concentraciones de 1500 ppm, 1000 ppm, 500

ppm, 50 ppm y 10 ppm (según Figura 2 y 3). Cada concentración preparada, fue por triplicado y depositado a cada tubo de ensayo (6 mL).

En los tubos de ensayo F1 – F3 se añadieron 6 mL de solución I.O 3% para los controles negativos y en los tubos de ensayo G1 – G3 se añadieron 6 mL de solución de $K_2Cr_2O_7$ en una concentración de 400ppm para los controles positivos. Para todos los tubos de ensayos, se pipeteó del vaso de precipitado 20 nauplios y se colocó en cada tubo de ensayo, posteriormente se cubrió con papel de aluminio (a todos los tubos de ensayo) y se colocó las lámparas de 20W a ambos costado durante 24 horas.

Determinación cuantitativa de supervivencia de nauplios:

Estos, fueron contados después de 24 horas de exposición al extracto evaluado. Se transfirió el contenido de todos los tubos de ensayo (de uno en uno) a un pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 12 pocillos, después se enjuagó el tubo con una pequeña cantidad de agua (si es necesario) para asegurar que todos los camarones son transferidos. Se contó los nauplios bajo un equipo de video de alta resolución, registrando así cantidades de nauplios muertos y vivos por separado. Moribundo (gravemente enfermo y a punto de morir o extremadamente letárgico) todavía se consideró vivo.

Se registró el número de camarones vivos y muertos en la hoja de datos y el cálculo de la diferencia de la cantidad inicial de camarones añadido, se repitió este procedimiento para todos los tubos, la eliminación de los contenidos del pozo cada vez. Se enjuagó bien con la solución IO y después se limpió, con una piceta cada tubo de ensayo.

Procesamiento de la información:

Los resultados medios de la mortalidad del nauplios de salmuera se representaron frente a los logaritmos de las concentraciones utilizando la herramienta de Análisis Probit del paquete de software estadístico SPSS de la que la mediana letal concentración (CL_{50}) en intervalos de confianza del 95% (IC) se calculó con el método de Finney (1971).^{38,39} La actividad biológica usando el ensayo del camarón de salmuera se registró como la concentración cuando el 50% de los nauplios murieron dentro de las 24 h de contacto con el

extracto evaluado. Los valores CL₅₀ por debajo de 249 ug/ mL fueron considerados como altamente tóxico, 250-499 ug/ mL toxicidad como medida y 500-1000 ug / mL como la toxicidad de la luz. Se consideraron valores por encima de 1000 ug/mL como no tóxicos.

D. Ensayo 2: actividad antiinflamatoria *in vitro*

Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria *in vitro* (propuesto por Priyanka C. *et al.*, 2012)

La mezcla de reacción (5 mL) consistió en 0,2 mL de albúmina de huevo (de huevo de gallina fresco), 2,8 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 6,4) y 2 mL de concentraciones variables de las muestras, de modo que las concentraciones finales se convirtieron en 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 ug/mL. Un volumen similar de agua bidestilada sirvió como control. A continuación, las mezclas se incubaron a 37 ± 2 ° C por 15 minutos y después se calentó a 70 °C durante cinco minutos. Después se dejó enfriar, se midió su absorbancia a 660 nm, mediante el uso del vehículo como blanco. Se utilizó Diclofenaco sódico, en las concentraciones de (78,125; 156,25; 312,5; 625,00; 1,250; 2,500 ug/mL) como el fármaco de referencia y tratados de manera similar para la determinación de la absorbancia.⁴⁰ El porcentaje de inhibición de desnaturalización de la proteína se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 \times \frac{[V_t - V_c]}{V_t}$$

Donde: V_t = absorbancia de la muestra,

V_c = absorbancia del control.

La concentración del extracto para 50% de inhibición (IC₅₀) se determinó por la curva de dosis-respuesta.

E. Ensayo 3: actividad antiinflamatoria *in vivo*

Evaluación de Actividad antiinflamatoria *in vivo* (protocolo del Instituto de Medicina Tradicional). Para cada concentración, se utilizaron 3 ratones y se midieron volúmenes normales de la pata derecha posterior de todos los ratones con una cinta métrica. Los extractos a evaluar se administraron por vía oral a dosis de 125mg/kg y 250mg/kg empleando jeringas con aguja

adaptada para ser usadas como sonda orogástrica, cuyo vehículo usado fue agua destilada. El grupo control negativo recibió solo el vehículo y el otro grupo dosis de Diclofenaco 10mg/kg.

Una hora después de la administración del extracto, se indujo el edema por vía subcutánea una solución de formol al 10% a nivel de la aponeurosis plantar derecho del ratón, provocando una reacción de carácter inflamatorio mediada por la liberación de diversos autocoides (histamina, prostaglandinas, etc) además diversos factores del complemento que están implicados en la amplificación de la respuesta. La inflamación se cuantificó midiendo el volumen de las patas a las 0, 1, 4 y 7 horas después de la inyección de formol al 10%. La diferencia de volumen entre la pata derecha inflamada y la misma pata derecha normal antes de la inyección de formol al 10% fue indicativo de grado de inflamación. El volumen de la pata derecha inflamada fue realizado con la ayuda de una cita métrica, tanto en diámetro como en largo.

Se calculó el volumen de inflamación producido, según lo siguiente:

$$\text{Volumen} = \pi /4d^2h$$

Donde:

d= diámetro de la pata

h=largo de la pata

Como resultado de porcentaje de inflamación, se usó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inflamación} = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

Donde:

V_t = volumen de la pata inflamada en un tiempo determinado.

V_0 = volumen normal (antes de la aplicación de formol al 10%).

Todos los ratones tenían una salud óptima y se encontraban en ayuno de 4 horas.

E.1 Modelo experimental

Tabla 1: Modelo experimental

Tratamientos	Repeticiones		
Dosis extracto 125 mg/kg	R1	R2	R3
Dosis extracto 250 mg/kg	R1	R2	R3
Control formol al 10%	R1	R2	R3
Diclofenaco USP	R1	R2	R3

Se aplicó el principio de las 3R (reducción, refinamiento, reemplazo), se utilizaron 12 animales de experimentación para cada una de las especies vegetales a evaluar y se realizaron 3 repeticiones a fin de verificar reproducibilidad e validación de la investigación. Se usaron en total 36 animales de experimentación.⁴¹

F. Ensayo 4: Análisis Químico de las especies vegetales

- a) Determinación de polifenoles totales: Se realizó la medida del índice de Folin, para lo cual se trataron 40 µl de muestra con 0,5 mL de reactivo de Folin- Ciocalteau y 2 mL de carbonato sódico al 20% (p/v), y se llevaron a 10 mL. Transcurrida media hora, se efectuó la lectura de absorbancia a 765 nm. Para establecer el calibrado, se utilizaron patrones de ácido gálico de concentraciones entre 0 - 1.000 mg/L.⁴²
- b) Determinación de antocianinas y flavonoides totales: Se pesó 0.5 g de muestra seca y pulverizada, se extrajo con tres volúmenes de 25 mL de etanol absoluto acidulado con 1% de ácido fórmico. El extracto se evaporó a sequedad en la estufa a una temperatura de 40°C. El residuo seco se disolvió en una solución de metanol al 50% acidulado con ácido fórmico y se llevó a un volumen de 10 mL. Se efectuó la determinación de antocianinas a una absorbancia de 535 nm y para los flavonoides se realizó la lectura a 374 nm.⁴²
- c) Determinación de catequinas y proantocianidoles: Se aplicó el ensayo de la vainillina, se mezcló 0,5 mL del extracto con 1,25 mL de vainillina en metanol (1%, p/v) y con 1,25 mL de ácido sulfúrico 25% (v/v) en metanol. El blanco se preparó simultáneamente del mismo modo, pero sustituyendo la solución de vainillina por metanol. Se efectuó la lectura de absorbancia a 500 nm pasados 15 minutos. El calibrado se realizó con soluciones de (+)-catequina (30, 60, 90, 120 mg/L).⁴²

- d) Análisis de alcaloides: Los materiales vegetales (100g) micropulverizadas se extrajeron con metanol durante 24 h en una extracción continua (soxhlet) aparato. El extracto se filtró y se evaporó el metanol en un evaporador rotatorio al vacío a una temperatura de 45 °C a sequedad. Una parte de este residuo se disolvió en HCl 2 N y después se filtró. Un mL de esta solución se transfirió a un embudo de separación y se lavó con 10 mL de cloroformo (3 veces). El pH de esta solución se ajustó a neutro con 0,1 N NaOH. A continuación se añadió 5 mL de solución de verde bromocresol (BCG) y 5 mL de tampón fosfato a esta solución. La mezcla se agitó y el complejo formado se extrajo con 1, 2, 3, y 4 mL de cloroformo por agitación vigorosa. Los extractos se recogieron en un matraz aforado de 10 mL y se diluyeron a volumen con cloroformo. La absorbancia del complejo en cloroformo se midió a 470 nm.⁴³
- e) Análisis de saponinas: Para esta determinación se hizo uso de la adición del reactivo de Lieberman-Burchard (LB) para formar productos coloridos al reaccionar con saponinas. El reactivo LB consistió en una mezcla al 16,7 % de Anhídrido acético en Ácido sulfúrico concentrado. Inicialmente se elaboró una curva de calibración Absorbancia vs. Concentración utilizando un estándar obtenido en Chile. Para esta curva se prepararon soluciones a las siguientes concentraciones: 0,00; 0,05; 0,1; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35 mg/mL, de cada concentración se prepararon 2 mL, a los cuales se adicionaron 7 mL del reactivo de LB, se agitó 20s con un vortex y se dejó en reposo 30 min. Finalmente se determinó la longitud de onda de la máxima absorción (λ max) para realizar las lecturas posteriores en el espectrofotómetro, se realizó un barrido con el estándar. (La λ max, de saponinas de quinua es de 528 nm) y a esta longitud de onda se realizaron las mediciones para la curva de calibración y posteriormente para las muestras seleccionadas. A partir de la curva de calibración se pudo cuantificar el porcentaje de saponinas presentes en cada muestra evaluada.⁴³

3.5 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Ensayo 1: Actividad citotóxica *in vitro* - Anexo: figura 3.

Ensayo 2: Actividad antiinflamatorio *in vitro* - Anexo: figura 5

Ensayo 3: Actividad antiinflamatorio *in vivo* - Anexo: figura 6

Ensayo 4: cuantificación de metabolitos secundarios: se utilizaron técnicas espectrofotométricas UV/vis y cromatográficas, para lo cual se utilizó extractos metanólicos y etanólicos de las seis especies vegetales en estudio. Se midieron polifenoles totales, flavonoides, antocianinas, catequinas y proantocianidoles, saponinas y alcaloides.

3.6 Aspectos éticos

La utilización de animales en pruebas de laboratorio es diferente a la experimentación animal en el sentido de que el principal objetivo de las pruebas es establecer si un producto es seguro para su uso (por ejemplo, las vacunas, los fármacos biológicos entre otros). Dentro de esta problemática, cada día más apasionante de los animales de laboratorio, son, con toda seguridad, los aspectos relacionados con la ética de su utilización los que se encuentran sometidos a críticas dispares y conflictivas.

Es por ello que los científicos conscientes de su responsabilidad, que naturalmente es la nuestra y que podría quedar planteada en el siguiente concepto pragmático: Los animales de laboratorio pueden y deben ser utilizados como reactivos biológicos y ecológicos, en beneficio de la ciencia y la salud pública, siempre que no se cuente con otras técnicas que los puedan sustituir, aunque sean muy sofisticados, sin olvidar que se trata de seres vivos, que sienten y sufren dolor.

Por tanto se ha de procurar que el sufrimiento sea el menor posible; en una palabra el investigador debe actuar en este caso con una rigurosa ética de “deber y responsabilidad” con respecto a los animales, tanto en cría y manejo, como en las practicas experimentales a que necesariamente deben ser sometidos.

Dentro de este contexto la presente investigación en enmarca en los

principios expuestos en 1959 por Rusell y Burch, en su interesante publicación “The principles of humane experimental Technique”, que pueden resumirse en la obligación que tienen los investigadores de solo utilizar los animales imprescindibles, manipularlos con sentido ético de responsabilidad y sobre todo, evitar, siempre que no perjudique la experiencia, el más mínimo dolor, empleando para ello los analgésicos más convenientes en cada caso.⁴¹

CAPITULO IV: RESULTADOS

Actividad citotóxica

Tabla 2: Cantidad de nauplios de *Artemia franciscana* inyectados

Especies vegetales	[] de extractos													
	10 ppm		50 ppm		500 ppm		1000 ppm		1500 ppm		I.O 3% (-)	K ₂ Cr ₂ O ₇ 400 ppm (+)		
<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam	A ₁	20	B ₁	20	C ₁	20	D ₁	20	E ₁	20	F ₁	20	G ₁	20
	A ₂	20	B ₂	20	C ₂	20	D ₂	20	E ₂	20	F ₂	20	G ₂	20
	A ₃	20	B ₃	20	C ₃	20	D ₃	20	E ₃	20	F ₃	20	G ₃	20
	TOTALES	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
<i>Garcinia madruno</i> (Kunth) Hammel	A ₁	20	B ₁	20	C ₁	20	D ₁	20	E ₁	20	F ₁	20	G ₁	20
	A ₂	20	B ₂	20	C ₂	20	D ₂	20	E ₂	20	F ₂	20	G ₂	20
	A ₃	20	B ₃	20	C ₃	20	D ₃	20	E ₃	20	F ₃	20	G ₃	20
	TOTALES	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Huth	A ₁	20	B ₁	20	C ₁	20	D ₁	20	E ₁	20	F ₁	20	G ₁	20
	A ₂	20	B ₂	20	C ₂	20	D ₂	20	E ₂	20	F ₂	20	G ₂	20
	A ₃	20	B ₃	20	C ₃	20	D ₃	20	E ₃	20	F ₃	20	G ₃	20
	TOTALES	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60

Fuente: Elaboración propia

La Tabla 2 muestra la cantidad de nauplios de *Artemia franciscana* inyectados en cada tubo de ensayo haciendo un total de 60 por cada una de las concentraciones evaluadas, más su respectivo control negativo y control positivo; todas ellas para ser evaluadas en un tiempo de 24 horas.

Tabla 3. Conteo de nauplios vivos y muertos de *Artemia franciscana* en las disoluciones

Especie vegetal	Parte usada	[]	Nauplios de Artemia		
			Total	Vivos	Muertos
<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam	Corteza	10 ppm	60	0	60
		50 ppm	60	0	60
		500 ppm	60	0	60
		1000 ppm	60	4	56
		1500 ppm	60	11	49
		I.O. 3% (-)	60	60	0
		K ₂ Cr ₂ O ₇			
		400 ppm (+)	60	0	60
		10 ppm	60	0	60
		50 ppm	60	0	60
<i>Garcinia madruno</i> (Kunth) Hammel	Corteza	500 ppm	60	0	60
		1000 ppm	60	8	52
		1500 ppm	60	26	34
		I.O. 3% (-)	60	60	0
		K ₂ Cr ₂ O ₇			
		400 ppm (+)	60	0	60
		10 ppm	60	0	60
		50 ppm	60	0	60
		500 ppm	60	0	60
		1000 ppm	60	0	60
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Huth	Hojas	1500 ppm	60	45	15
		I.O. 3% (-)	60	60	0
		K ₂ Cr ₂ O ₇			
		400 ppm (+)	60	0	60

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3, muestra la cantidad de nauplios vivos y muertos después de 24 horas expuestas a los extractos de *Guazuma ulmifolia* Lam, *Garcinia madruno* (Kunth) Hammel y *Cajanus cajan* (L.) Huth; por cada una de las concentraciones evaluadas con su respectivo control negativo (solución I.O.) y control positivo (K₂Cr₂O₇ 400 ppm).

Tabla 4: Cálculo del porcentaje de efecto, valores probit relacionados y CL₅₀

Especie vegetal	[] ppm	Log []	% efecto	Probit	CL ₅₀
<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam	10	1,00	99	8,09	9,12 ppm
	50	1,70	99	8,09	
	500	2,70	99	8,09	
	1000	3,00	88	7,05	
	1500	3,18	67	5,44	
<i>Garcinia madruno</i> (Kunth) Hammel	10	1,00	99	8,09	2,14 ppm
	50	1,70	99	8,09	
	500	2,70	99	8,09	
	1000	3,00	87	6,88	
	1500	3,18	57	5,18	
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Huth	10	1,00	99	8,09	1,52 ppm
	50	1,70	99	8,09	
	500	2,70	99	8,09	
	1000	3,00	99	8,09	
	1500	3,18	25	4,33	

Fuente: Elaboración propia

Tabla 4, muestra el porcentaje de efecto, valores probit relacionados y CL₅₀ siendo para *Guazuma ulmifolia* Lam 9,12ppm; *Garcinia madruno* (Kunth) Hammel 2,14ppm; y, *Cajanus cajan* (L.) Huth 1,52ppm.

Actividad antiinflamatoria *in vitro*

Tabla 5: Porcentaje de inhibición antiinflamatoria

Especie vegetal	CONCENTRACIONES (ug/mL)						λ
	31,25 % INH	62,50 % INH	125,00 % INH	250,00 % INH	500,00 % INH	1000 % INH	
<i>Remijia pedunculata</i> (H. Karst.) Flueck	35,88	37,59	41,20	47,98	50,06	61,82	
<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.	34,17	37,70	43,10	45,42	45,48	61,48	660 nm
<i>Vitex pseudolea</i> Rusby	33,68	36,05	45,18	48,51	51,91	58,71	

Fuente: Elaboración propia

Tabla 5, muestra el porcentaje de inhibición antiinflamatoria a las diferentes concentraciones evaluadas.

Tabla 6. Cálculo de IC₅₀ a partir de la ecuación obtenida con su respectivo R²

Especie vegetal	Ecuación	R ²	IC ₅₀
<i>Remijia pedunculata</i> (H. Karst.) Flueck	$y = 7,1677\ln(x) + 8,655$	0,9254	319,97
<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.	$y = 6,6903\ln(x) + 9,9272$	0,8449	399,29
<i>Vitex pseudolea</i> Rusby	$y = 7,2614\ln(x) + 8,0866$	0,9768	321,21

Fuente: Elaboración propia

El Tabla 6 muestra los valores de IC₅₀ de las tres especies vegetales estudiadas.

Actividad antiinflamatoria *in vivo*

Tabla 7. Administración de extractos, según tratamiento y tiempo

Especie vegetal	TRATAMIENTOS				T.ADM.
	Grupo 1 []125 mg/kg (promedio volumen de patas en cm3)	Grupo 2 []250 mg/kg (promedio volumen de patas en cm3)	Grupo 3 Control formol 10% (promedio volumen de patas en cm3)	Grupo 4 Diclofenaco 10mg/kg (promedio volumen de patas en cm3)	
<i>Remijia pedunculata</i> (H. Karst.) Flueck	3,18	3,57	3,53	4,37	0 HORAS
<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.	4,08	4,14	3,02	3,99	
<i>Vitex pseudolea</i> Rusby	4,38	3,80	4,09	4,37	
<i>Remijia pedunculata</i> (H. Karst.) Flueck	4,04	4,71	4,34	4,97	1 HORA
<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.	4,95	5,17	3,85	4,45	
<i>Vitex pseudolea</i> Rusby	5,17	4,86	4,74	5,12	
<i>Remijia pedunculata</i> (H. Karst.) Flueck	4,56	5,51	6,30	5,87	4 HORAS
<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.	5,31	5,26	5,58	5,27	
<i>Vitex pseudolea</i> Rusby	5,81	5,83	6,41	5,83	
<i>Remijia pedunculata</i> (H. Karst.) Flueck	4,56	5,29	6,95	5,55	7 HORAS
<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.	5,31	5,18	5,99	5,27	
<i>Vitex pseudolea</i> Rusby	5,79	5,62	6,71	5,66	

Fuente: Elaboración propia

Tabla 7 muestra los promedios de volumen de patas en cm³, según administración de extractos, con los diferentes grupos de tratamiento y tiempo en 0, 1, 4 y 7 horas.

Tabla 8. Porcentajes de inflamación de cada Tratamiento

Especie vegetal	TRATAMIENTOS								T. ADM.
	Grupo 1 [] 125 mg/kg	% INF.	Grupo 2 [] 250 mg/kg	% INF.	Grupo 3 Control formol 10%	% INF.	Grupo 4 Diclofenaco 10mg/kg	% INF.	
<i>Remijia pedunculata</i> (H. Karst.) Flueck	3,18	--	3,57	--	3,53	--	4,37	--	0 HORAS
<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.	4,08	--	4,14	--	3,02	--	3,99	--	
<i>Vitex pseudolea</i> Rusby	4,38	--	3,80	--	4,09	--	4,37	--	
<i>Remijia pedunculata</i> (H. Karst.) Flueck	4,04	27,17	4,71	32,08	4,34	22,78	4,97	13,58	1 HORAS
<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.	4,95	21,28	5,17	25,12	3,85	27,40	4,45	11,63	
<i>Vitex pseudolea</i> Rusby	5,17	18,03	4,86	27,97	4,74	15,74	5,12	17,13	
<i>Remijia pedunculata</i> (H. Karst.) Flueck	4,56	43,30	5,51	54,52	6,30	78,42	5,87	34,28	4 HORAS
<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.	5,31	29,99	5,26	27,14	5,58	84,59	5,27	32,00	
<i>Vitex pseudolea</i> Rusby	5,81	32,72	5,83	53,33	6,41	56,74	5,83	33,40	
<i>Remijia pedunculata</i> (H. Karst.) Flueck	4,56	43,30	5,29	48,47	6,95	96,71	5,55	26,81	7 HORAS
<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.	5,31	29,99	5,18	25,22	5,99	98,25	5,27	32,00	
<i>Vitex pseudolea</i> Rusby	5,79	32,23	5,62	47,90	6,71	64,05	5,66	29,49	

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 8, se observa los porcentajes de inflamación de cada tratamiento, donde se puede evidenciar que en el grupo control negativo (formol 10%) se logró formar edema a nivel de la aponeurosis plantar derecho del ratón, siendo este indicativo de grado inflamación. Asimismo, se puede evidenciar que en el Grupo 1 las tres especies vegetales muestran mejor actividad antiinflamatoria en comparación con el grupo 4 (Diclofenaco 10mg/kg).

Metabolitos secundarios

Tabla 9. Cuantificación de componentes químicos

Especie vegetal	Fenoles totales mg/g	Flavonoide s mg/g	Antocianina s mg/g	Catequinas mg/g
<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam	65,1840	0,8204	0,0342	0,00003
<i>Garcinia madruno</i> (Kunth) Hammel	4,9787	0,8565	0,4180	0,00003
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Huth	3,9918	0,7714	0,4496	0,00004
<i>Remijia pedunculata</i> (H. Karst.) Flueck	2,8951	0,8613	0,2683	0,00003
<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.	6,5140	0,7759	0,2553	0,00002
<i>Vitex pseudolea</i> Rusby	5,8560	0,3955	0,0160	0,00003

Fuente: Elaboración propia

Tabla 9 muestra la cuantificación de componentes químicos y la especie vegetal que presenta la mayor cantidad de fenoles totales es *Guazuma ulmifolia* Lam con 65,1840 mg/g; *Remijia pedunculata* (H. Karst.) Flueck con 0,8613 mg/g de flavonoides; *Cajanus cajan* (L.) Huth 0,4496 mg/g de antocianinas y 0,00004 mg/g de catequinas respectivamente.

Tabla 10. Cuantificación de componentes químicos alcaloides

Especie vegetal	Alcaloides ug/mL
<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam	136,40
<i>Garcinia madruno</i> (Kunth) Hammel	86,00
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Huth	537,00
<i>Remijia pedunculata</i> (H. Karst.) Flueck	177,20
<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.	131,40
<i>Vitex pseudolea</i> Rusby	80,00

Fuente: Elaboración propia

Tabla 10 muestra la cuantificación de componentes químicos alcaloides donde *Cajanus cajan* (L.) Huth presenta la mayor cantidad con 537,00 ug/mL.

Tabla 11. Cuantificación de componentes químicos saponinas

Especie vegetal	Saponinas mg/g
<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam	2,69
<i>Garcinia madruno</i> (Kunth) Hammel	12,27
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Huth	11,39
<i>Remijia pedunculata</i> (H. Karst.) Flueck	12,17
<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.	12,42
<i>Vitex pseudolea</i> Rusby	5,03

Fuente: Elaboración propia

Tabla 11 muestra la cuantificación de componentes químicos saponinas donde *Garcinia macrophylla* Mart. presenta la mayor cantidad con 12,42 mg/g; *Garcinia madruno* (Kunth) Hammel con 12,27 mg/g y *Remijia pedunculata* (H. Karst.) Flueck con 12,17 mg/g.

CAPITULO V: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los compuestos fenólicos son importantes en los diferentes procesos de oxidación lipídica y están asociadas con la actividad antiinflamatoria y citotóxica (**Sokmen et al.** 2005; **Choi et al.** 2002)^{44,45}, también poseen efectos inhibitorios sobre la mutagénesis y carcinogénesis en humanos cuando son incluidos en la dieta diaria a partir de productos naturales. Los ácidos fenólicos y flavonoides son reconocidos como poseedores de actividad antiinflamatoria (**Pyo et al.** 2004)⁴⁶.

En la evaluación de la citotoxicidad sobre *Artemia franciscana*, nuestro estudio mostró valores de CL₅₀=9,12 ppm para *Guazuma ulmifolia* Lam; 2,14 ppm para *Garcinia madruno* (Kunth) Hammel y 1,52ppm para *Cajanus cajan* (L.) Huth, evidenciándose así que producen actividad citotóxica, ya que estos valores son considerados como altamente tóxicos; y esto concuerda con lo declarado por **Meyer et al (1982)** ⁽²⁶⁾, “un valor de CL₅₀ inferior a 1000 ug / mL se considera bioactivo”; y, en sentido puede tener actividad biológica.

La actividad antiinflamatoria *in vivo* evidenció resultados satisfactorios a 7 horas, la especie vegetal *Garcinia macrophylla* Mart. mostró mejor actividad antiinflamatoria a 125 mg/kg con un 29,99 % de inflamación en comparación con Diclofenaco que obtuvo un 32% de inflamación; *Vitex pseudolea* Rusby obtuvo un 32,23% de inflamación con respecto al Diclofenaco con 29,49%; concordando con los resultados obtenidos en la tesis “Atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico e frações de folhas da espécie *Vitex polígama*”⁽⁴⁷⁾ en cuanto a que el género *Vitex* perteneciente a la familia Lamiaceae presenta capacidad de inhibición de producción de mediadores inflamatorios de Oxido Nítrico (NO) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en macrófagos RAW 264.7 activados con lipopolisacaridos (LPS), siendo los flavonoides orientina e isoorientina los principales metabolitos responsables de la actividad observada.

Asimismo, *Remijia pedunculata* (H. Karst.) Flueck mostró actividad antiinflamatoria a 125 mg/kg con un 43,30 % de inflamación en comparación con Diclofenaco que obtuvo un 26,81% de inflamación.

Las especies vegetales sintetizan y acumulan metabolitos secundarios, las mismas que intervienen en interacciones complejas entre organismos vivos. En ese sentido se evaluó en las seis especies vegetales compuestos fenólicos: flavonoides, antocianinas y catequinas; considerándose que en la mayoría de los casos están cumpliendo un efecto protector de los radicales libres, y al parecer se encuentran mayormente en la parte superficial de las cortezas. Asimismo, alcaloides que son los de mayor concentración y posiblemente causantes de las actividades estudiadas. Se ha comprobado que en *Remijia pedunculata* (H. Karst.) Flueck, se encuentran alcaloides interesantes similares a la cinchona; y saponinas las mismas que tienen funciones diuréticas y reductora de colesterol aunque también son hemolíticas.⁴⁸

CAPITULO VI: PROPUESTA

- Contribuir al aprovechamiento sostenible de recursos vegetales en nuestra Amazonía, dando un valor agregado a las especies vegetales estudiadas; ya que demostraron tener actividad citotóxica y antiinflamatoria, generando alternativas de tratamiento etnofarmacológicos.
- Asimismo, se plantea seguir los estudios de investigación con especies vegetales de gran parte de nuestra Amazonía Peruana, realizando otras evaluaciones de actividades tales como: antioxidantes, antihiperglicemiantes, entre otras más; involucrando la búsqueda de principios activos útiles para la medicina, etnomedicina.

CAPITULO VII: CONCLUSIONES

1. En la evaluación de citotoxicidad sobre *Artemia franciscana*, nuestro estudio muestra valores de $CL_{50}=9,12$ ppm para *Guazuma ulmifolia* Lam; $CL_{50}=2,14$ ppm para *Garcinia madruno* (Kunth) Hammel y para *Cajanus cajan* (L.) Huth $CL_{50}=1,52$ ppm; siendo ésta especie vegetal la de mejor actividad. La presencia de metabolitos secundarios, tales como: alcaloides, compuestos fenólicos y saponinas; puede ser la causa de la actividad citotóxica mostrada en el extracto hidroalcohólico de las especies vegetales estudiadas.
2. La actividad antiinflamatoria **in vitro**, presenta mayor porcentaje de inhibición antiinflamatoria a 1000 ug/mL, de *Garcinia macrophylla* Mart. con 61,48%; *Vitex pseudolea* Rusby con 58.71% y *Remijia pedunculata* (H. Karst.) Flueck con 50.06%; mostrándose un IC_{50} de 399,29; 321,21 y 319,97 respectivamente.
3. La actividad antiinflamatoria **in vivo** mostró resultados satisfactorios a 7 horas, la especie vegetal *Garcinia macrophylla* Mart. presentó mejor actividad antiinflamatoria a 125 mg/kg con un 29.99 % de inflamación en comparación con Diclofenaco que obtuvo un 32% de inflamación. *Vitex pseudolea* Rusby obtuvo un 32.23% de inflamación con respecto al Diclofenaco con 29.49%; y, la especie vegetal *Remijia pedunculata* (H. Karst.) Flueck mostró actividad antiinflamatoria a la concentración de 125 mg/kg con un 43.30 % de inflamación en comparación con el Diclofenaco que obtuvo un 26.81% de inflamación.
4. Se cuantificó metabolitos secundarios, las especies vegetales que presentaron valores altos correlacionan con su actividad citotóxica y antiinflamatoria, tienen buen contenido en fenólicos y alcaloides totales, siendo estos que intervienen en interacciones complejas de las especies vegetales y el medio.

CAPITULO VIII: RECOMENDACIONES

1. En relación a las seis especies vegetales estudiadas, es oportuno continuar estudiando los componentes químicos mediante cromatografía de gases (GC-FID) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), ultravioleta visible (UV-Vis), infrarrojo (IR), cromatografía de columna.
2. La prueba de *Artemia spp.* es útil para la evaluación de extractos de plantas con el fin de predecir su toxicidad. Sin embargo, aunque el método ofrece ventajas tales como rapidez, simplicidad y bajo costo, debe estar sujeto a una validación entre otras pruebas, tales como toxicidad oral a 60 o 90 días.
3. Las actividades antiinflamatoria *in vitro* e *in vivo* mediante la aplicación de otras técnicas, tales como la de estabilización de membrana plasmática en eritrocitos, modelo de inflamación aguda edema auricular por TPA (acetato de tetradecanoilforbol).
4. Seguir llevando a cabo estudios de otras especies vegetales de nuestra región Loreto, en relación a su actividad citotóxica, antiinflamatoria y antioxidante, porque de esta forma se estará contribuyendo a otros campos de la investigación científica; dando un mayor realce con valor agregado al desarrollo sostenible.

CAPITULO IX: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Osorio Durango, Edinson. Búsqueda de sustancias bioactivas a partir de dos especies de la flora colombiana: alcaloides de *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) y biflavonoides de *Garcinia madruno* (Clusiaceae). Universidad de Barcelona (2008) Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/277137007_Busqueda_de_sustancias_bioactivas_a_partir_de_dos_especies_de_la_flora_colombiana_a_alcaloides_de_Phaedranassa_dubia_Amaryllidaceae_y_biflavonoides_de_Garcinia_madruno_Clusiaceae?enrichId=rgreq-83e4854c31e66e55448d60d52607f283-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzI3NzEzNzAwNztBUzoyNTEwODUyNTUwMjY2ODhAMTQzNjg3Mzg0NDg5OQ%3D%3D&el=1_x_2&esc=publicationCoverPdf Fecha de acceso: 29 Marzo 2018
2. Williamson EM, Okpako DT. 1996. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. England, Wiley and Sons. Pp: 503
3. Osadebe PO, Odoh EU, Uzor PF. The search for new hypoglycemic agents from plant. Afr J Pharmacol; 8(11): 292-303. Doi:10.5897/AJPP2014.3933.
4. Williamson EM, Okpako DT. 1996. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. England, Wiley and Sons. Pp: 503
6. Gonçalves Regiane, Ayres Vanessa F.S., Carvalho Carlos E., Souza Maria G.M., Guimarães Anderson C., Corrêa Geone M. et al. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Vitex agnus-castus* L. (Lamiaceae). An. Acad. Bras. Ciênc. [Internet]. 2017 Dec [cited 2018 June 24] ; 89(4): 2825-2832. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720170428>
7. Andres Matulevich Pelaez, Javier. (2016). Composición Química del Aceite Esencial de Hojas de *Guazuma ulmifolia* (Malvaceae). DOI:

10.22517/23447214.13061.

Disponible

en:

<https://www.researchgate.net/publication/317797918> Composicion Quimica del Aceite Esencial de Hojas de Guazuma ulmifolia Malvaceae Fecha de acceso: 06 Abril 2018

8. [Luis Carrillo-Hormaza](#), [Ana M. Ramírez](#), [Camilo Quintero-Ortiz](#), [Marlon Cossio](#), [Sonia Medina](#), [Federico Ferreres](#), [Angel Gil-Izquierdo](#), [Edison Osorio](#). Comprehensive characterization and antioxidant activities of the main biflavonoids of *Garcinia madruno*: A novel tropical species for developing functional products. [Journal of Functional Foods Volume 27](#), December 2016, Pages 503-516. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464616303140?via%3Dihub> Fecha de acceso: 10 Junio 2018
9. Hilda Elisa Ramírez Salcedo, Gil Virgen-Calleros, José de Jesús Vargas-Radillo, Eduardo Salcedo- Pérez y Lucía Barrientos-Ramírez. Actividad antimicrobiana in vitro de extractos de hoja de *Guazuma ulmifolia* Lam. contra fitopatógenos. *Rev. mex. de cienc. forestales* vol.6 no.27 México ene./feb. 2015 Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322015000100010 Fecha de acceso: 02 Abril 2018
10. Edison Osorio, Julián Londoño and Jaume Bastida. Article Low-Density Lipoprotein (LDL)-Antioxidant Biflavonoids from *Garcinia madruno*. *Molecules* **2013**, *18*(5), 6092-6100; doi:[10.3390/molecules18056092](https://doi.org/10.3390/molecules18056092) Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/5/6092/htm> Fecha de acceso: 09 de Junio 2018.
11. Hoyos Baraona, T. Determinación de la concentración de taninos en las hojas, corteza y frutos de la especie de Guácimo (*Guazuma ulmifolia* Lam). [Tesis para obtener el título de Ingeniero Forestal] Cajamarca Perú: Universidad Nacional de Cajamarca (2014). Disponible en: <http://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/UNC/414/T%20K10%20H>

[678%202014.pdf?sequence=1&isAllowed=y](#) Fecha de acceso: 02 Abril 2018

12. Quintanilla- Alca J. Evaluación de la actividad antioxidante y cuantificación de quercetina en dos especies de frijol: frijol palo (*Cajanus cajan* L.) y frijol Chaucha (*Phaseolus vulgaris* L.). [Tesis de grado para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias]. Tingo María: Universidad Nacional Agraria de la Selva (2012).
13. V.N. Alexéiev. Análisis cuantitativo (1988). Editorial MIR Moscú, pág. 11
14. Rojas L, Jaramillo C, Lemus M. (2015). Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios. Ecuador: Universidad Técnica de Machala.
15. Ávalos A, Pérez Urria E. Metabolismo secundario de las plantas. Rev. RE. (2009); Vol. 2, N° 3. 119-145.
16. Facchini, P.J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52:29-66
17. Thakur, M., Melzig, M.F., Fuchs, H., Weng, A. (2011). Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. Botanic: Targets and Therapy 1 : 19–29.
18. Wina, E., Muetzel, S., Becker, K. (2005). The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Productions A Review. University of Hohenheim - Germany, Indonesian Research Institute for Animal Production – Indonesia.

19. Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. (2006). Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In: Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (Eds.), *Plant Secondary Metabolites Occurrence Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing, Chennai, India, pp. 1–24.
20. Strack D, Wray V. The Anthocyanins. In: HARBONE JB, editor. *The Flavonoides. Advances in Research Since 1986*. Boca Raton FL: CRC Press; 1994.
21. Wagner GJ. Cellular and Subcellular Location in Plant Metabolism. In: CREASY L, HRAZDINA G. editors. *Recent advances in Phytochemistry*. New York: Plenum Press; 1982. p. 1-45.
22. Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. AMV Ediciones. España. 225p.
23. Wink, M., and Schimmer, O. 1999. Modes of action of defensive secondary metabolites. pp. 17-134. In: M. Wink M. (ed.). *Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology*. Sheffield Academic Press. Sheffield, England. 304 p.
24. Freshney RI. 2000. *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*. Ed. Wiley-Liss: Nueva York, pp. 101,182, 309.
25. Cañas, A., Ramírez, J., Valle, A. (2003). Determinación de la bioactividad citotóxica in vitro de extractos de veinticinco especies vegetales mediante el ensayo con *Artemia salina*. Universidad de el salvador. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/5668/>
26. Meyer, B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E., Mc Laughlin J.L.: Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta médica*. 45:31-4, 1982.

27. Balandrin M., Kinghorn A, Farnsworth N. (1993). Plant-Derived Natural Products in Drug Discovery and Development: An Overview. Human Medicinal Agents from Plants. (A. D. Kinghorn, M. F. Balandrin, eds.) ACS Symposium Series 534; American Chemical Society: Washington, D.C., Pp 2-12.
28. Hostettmann K., Wolfender J. (1997). "Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts" Plant Med 63: 2-10.
29. Becerra Mejia E., Heredia Luis L. Actividad analgésica y antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ruellia graecizans* Backer (paque-paque) en ratones. [Tesis de grado para optar el título de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Wiener (2017).
30. Bosisio A. Catálogo de la Familia Fabaceae representada en el Herbario del Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino" de Santa Fe. [Serie Catálogos N° 17]. (2007). Disponible en http://www.museoameghino.gob.ar/archivos/repositorios/126_descarga_84_bosisio_andrea.pdf Fecha de acceso: 29 Marzo 2018
31. Hanan Alipi, A.M. & Mondragón Pichardo, J. 2009. Malezas de México, Ficha-Cajanus cajan. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/220983/Cajanus_cajan.pdf Fecha de acceso: 28 Marzo 2018
32. Rivero, J.A., Brunner, B.R. (2006). Árboles frutales exóticos y poco conocidos en Puerto Rico. pp. 71-73. La Editorial Universidad de Puerto Rico, Puerto Rico.
33. Bacuripari - *Garcinia macrophylla* Mart. Disponible en: <http://www.growables.org/information/TropicalFruit/Bacuripari-garcinia.htm> Fecha de acceso: 07 Abril 2018

34. Calix. Simillina precedenti, a qua tantum differt corollis violaceis, et calycibus coccineis. Habitat in hoc N.R. Granatensi. S.M. Disponible en: [http://bibdigital.rjb.csic.es/Imagenes/Ff\(8\)MUT_FI_Exp_Bot_N_Gra_44/MUT_FI_Exp_Bot_N_Gra_44_174.pdf](http://bibdigital.rjb.csic.es/Imagenes/Ff(8)MUT_FI_Exp_Bot_N_Gra_44/MUT_FI_Exp_Bot_N_Gra_44_174.pdf) Fecha de acceso: 07 Abril 2018
35. *Guazuma ulmifolia* lam. (1789). Sterculiaceae. Publicado en: Encyclopédie Méthodique, Botanique 3: 52. 1789. (en línea). Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles_doctos/66-sterc1m.pdf Fecha de acceso: 8 Junio 2010
36. Petit, J. 1994. Árboles y arbustos forrajeros. Venezuela, Instituto Forestal Latinoamericano. 174 p.
37. Efecto de diferentes sustratos orgánicos en el crecimiento de plantones de paliperro (*Vitex pseudolea* rusby) en fase de vivero. [Tesis de grado para optar el título de Ingeniero en recursos renovables]. Tingo María: Universidad Nacional Agraria de la Selva (2014). Disponible en: <http://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/UNAS/617/T.FRS-220.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Fecha de acceso: 29 Marzo 2018
38. *Guazuma ulmifolia* lam. (1789). Sterculiaceae. Publicado en: Encyclopédie Méthodique, Botanique 3: 52. 1789. (en línea). Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles_doctos/66-sterc1m.pdf Fecha de acceso: 8 Junio 2010
39. Liang P. y Macrae T. (1999). The synthesis of a small heat shock/alphacrystallin protein in *Artemia* and its relationship to stress tolerance during development. *Dev Biol*, 207:445-56. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10068475> Fecha de acceso: 30 de Abril 2017.

40. Priyanka Chatterjee, Sangita Chandra, Protapaditya Dey, and Sanjib Bhattacharya. Evaluation of anti-inflammatory effects of green tea and black tea: A comparative *in vitro* study. J Adv Pharm Technol Res. 3(2): 136–138. 2012.
41. De la Torre A., Figueroa J., Martínez L. (2001). El código de ética en la experimentación animal no puede ser letra muerta. Centro para el control estatal de la calidad de los medicamentos. Anuario Toxicología 1(1):140-5. Consultado el 27 diciembre del 2017.
42. Shamsa F, Monsef H, Ghamooshi R, Verdian-rizi M. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. Thai J. Pharm. Sci. 2008; N°32, 17-20.
43. Lozano M, Ticona E, Carrasco C, Flore G, Almanza G. Cuantificación de saponinas en residuos de quinua real. *Chenopodium quino*. Willd. Revista Boliviana de Química. 2012; Vol. 29, N°2, 128-135.
44. Sokmen M. In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. Life Sciences: 76 (25), 2981-2993 (2005).
45. Choi C.W. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison, Plant Science: 163, 1161-1168 (2002).
46. Pyo Y.H., T.C. Lee, L. Logendra Y R.T. Rosen, Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cykla*) extracts, Food Chem.: 85, (19), 19-26 (2004).
47. Atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico e frações de folhas da espécie *Vitex polygama*. [Tesis de post grado para optar el título de Magister en ciencias]. Río de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro (2017). Disponible en:

<https://www.macaue.ufrj.br/ppgprodbio/images/Dissertacoes/Dissertacao-Renata-Mello.pdf> Fecha de acceso: 29 Setiembre 2018

48. Gómez-Caravaca A, lafelice G, Lavini A, Pulvento C, Caboni C, & Marconi E (2012). Phenolic Compounds and Saponins in Quinoa Samples (Chenopodium quinoa Willd.) Grown under Diferent Saline and Non saline Irrigation Regimens. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2012 60 (18), 4620-4627. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/266969103_Saponinas Fecha de acceso: 10 Enero 2019.

ANEXOS

Figura 1. Dilución del extracto para el experimento citotoxicidad

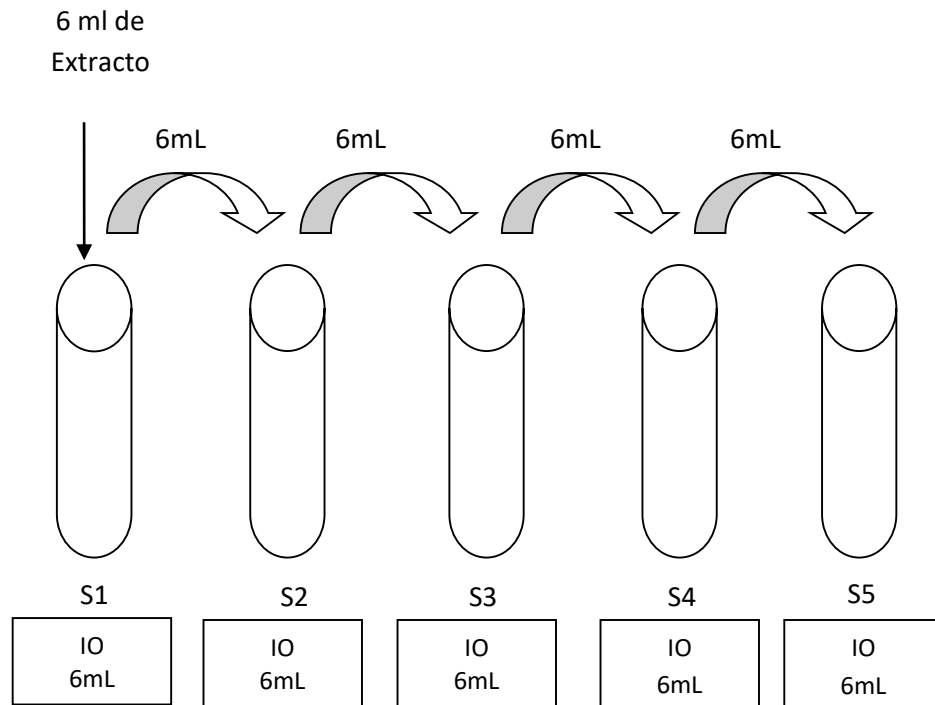


Figura 2. Configuración de experimento citotoxicidad

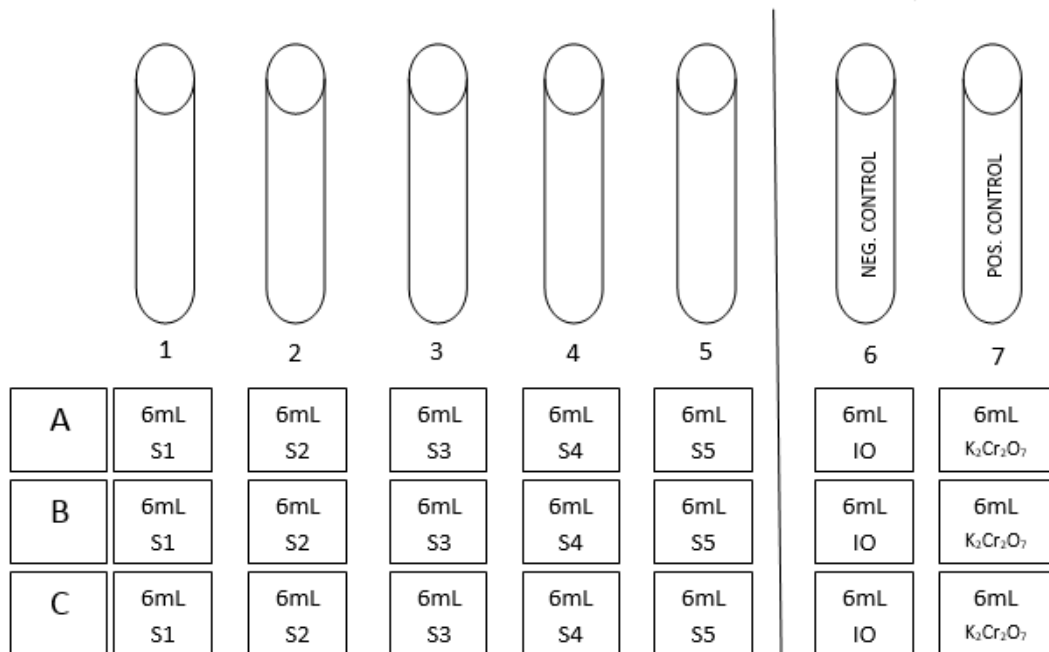


Figura 3: Flujograma preparación de extractos Hidroalcohólicos (Etanólico)

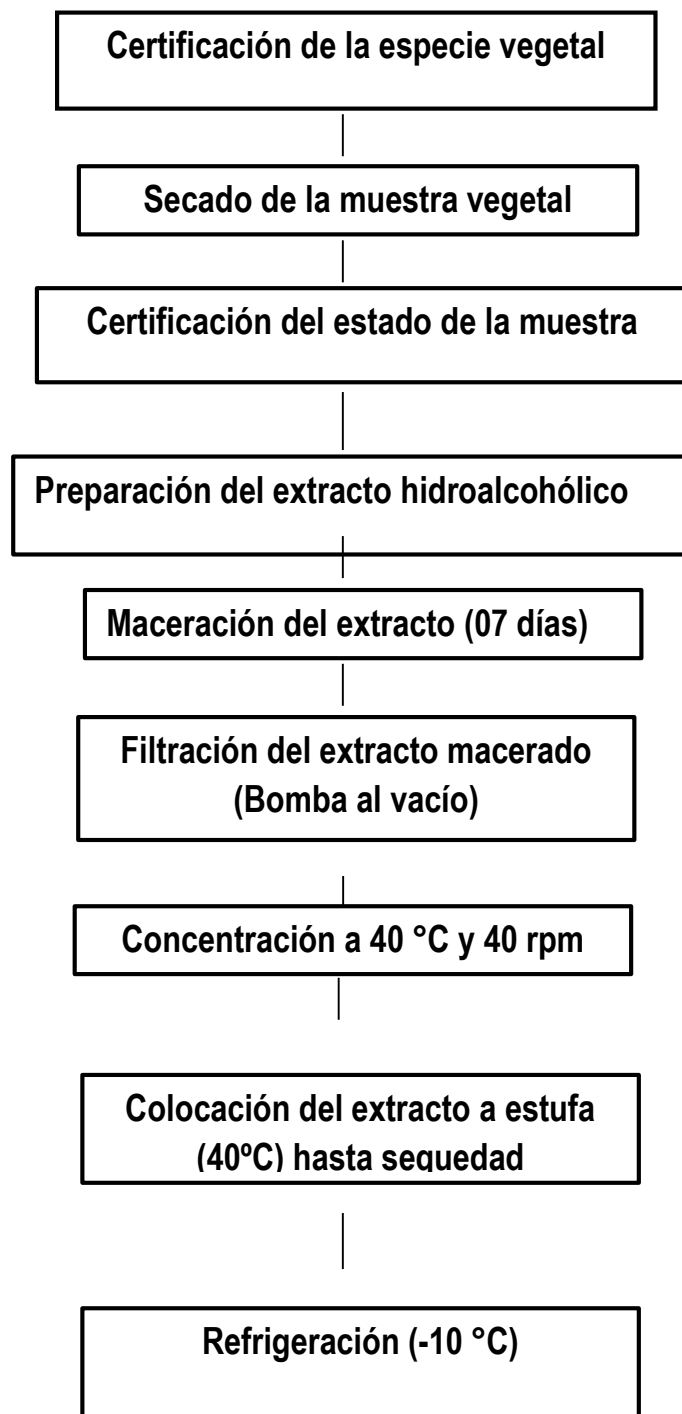


Figura 4: Hoja de trabajo_ ensayo de toxicidad por *Artemia franciscana*

CÍRCULO DE ESTUDIOS DE PLANTAS MEDICINALES 133-2015-FONDECYT

AREA DE FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA

HOJA DE TRABAJO
ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA POR *Artemia franciscana*

REGISTRO DE DATOS Y RESULTADOS

FECHA:
H. INICIO:
H. TERMINO:

CANTIDAD DE LARVAS INYECTADAS

Muestra	Extracto de:					Control (-)	Control (+)	
	[c]	S1	S2	S3	S4	S5	S7	S8
repeticiones		1500	1000	500	50	10	Sol. IO 3%	400 ppm $K_2Cr_2O_7$
1ª réplica A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	
2ª réplica B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	
3ª réplica C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	

CONTEO DE LARVAS VIVAS Y MUERTAS DE *Artemia franciscana* EN LAS DISOLUCIONES

FECHA:

Muestra	[c] ug/ml	Repeticiones	LARVAS DE <i>Artemia</i>			
			Total	Vivas	Muertas	% Letal
..... (Sol. IO 3%)	51 1500 ppm	1ª repeticiónA1 2ª repeticiónB1 3ª repeticiónC1 Total				
..... (Sol. IO 3%)	52 1000 ppm	1ª repeticiónA2 2ª repeticiónB2 3ª repeticiónC2 Total				
..... (Sol. IO 3%)	53 500 ppm	1ª repeticiónA3 2ª repeticiónB3 3ª repeticiónC3 Total				
..... (Sol. IO 3%)	54 50 ppm	1ª repeticiónA4 2ª repeticiónB4 3ª repeticiónC4 Total				
..... (Sol. IO 3%)	55 10 ppm	1ª repeticiónA5 2ª repeticiónB5 3ª repeticiónC5 Total				

Figura 5: Hoja de trabajo_ conteo de larvas vivas / muertas de *Artemia franciscana*

CÍRCULO DE ESTUDIOS DE PLANTAS MEDICINALES 133-2015-FONDECYT

CONTEO DE LARVAS VIVAS Y MUERTAS DE *Artemia franciscana* DEL CONTROL (-) Y (+)

Muestra	[c] ug/ml	Repeticiones	LARVAS DE ARTEMIA			
			Total	Vivas	Muertas	%Letal
Solución IO 3% (Control negativo)	S7	1° Repetición A7				
		2° Repetición B7				
		3° Repetición C7				
		Total				
Solución $K_2Cr_2O_7$ (Control positivo)	S8 400	1° Repetición A8				
		2° Repetición B8				
		3° Repetición C8				
		Total				

RESULTADOS Y CÁLCULO DE LA CL_{50} DE LA MUESTRA FRENTE A LAS LARVAS DE *Artemia*

Muestra	[c] ug/ml	Repeticiones	LARVAS DE ARTEMIA				CL_{50} ug/ml
			Total	Vivas	Muertas	%Letal	
(En Sol. IO 3%)	1500 ppm	total					
	1000 ppm	total					
	500 ppm	total					
	50 ppm	total					
	10 ppm	total					

Con los resultados se grafica [c] vs [% larvas vivas] y se obtiene una línea recta y se aplica la ecuación $y=mx+b$, se determina la pendiente (m) y el intercepto (b) y con estos datos se aplica a $Y=50\%$ para obtener la concentración.

* Clasificación Toxicidad según CYTED

RESULTADOS DEL CONTROL (-) Y (+) FRENTE A LAS LARVAS DE *Artemia*

Muestra	[c] ug/ml	Repeticiones	LARVAS DE ARTEMIA				CL_{50} ug/ml
			Total	Vivas	Muertas	%Letal	
Sol. IO 3%		total					
Solución $K_2Cr_2O_7$	400 ppm	total					

** Según referencias

TABLA DE CLASIFICACIÓN DE TOXICIDAD SEGUN CYTED

GRUPO	CATEGORÍA	ESCALA (ug/ml)
I	Extremadamente tóxico	1 - 10
II	Altamente tóxico	10 - 100
III	Moderadamente tóxico	100 - 500
IV	Ligeramente tóxico	500 - 1000
V	Prácticamente no tóxico	1000 - 1500
VI	Relativamente Inócuo	>1500

Figura 6: Hoja de trabajo_ preparación de extracto

ÁREA DE FITOQUÍMICA

PREPARACIÓN DE EXTRACTO
CÓDIGO:

DATOS GENERALES

FECHA:

PLANTA:

NOMBRE CIENTÍFICO:

PARTE DE LA PLANTA:

MUESTRA:

TIPO DE EXTRACTO:

MÉTODO o TÉCNICA:

N°

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

Equipo

Pasos

1. Extracción
2. Filtración
3. Concentración

1. EXTRACCIÓN			SEPARACIÓN	FILTRACIÓN	ST - PA - FITOCOMP	OBSERVACIONES
HIRAT	LICUA	MACER				
1. pp droga/s			1. Separación		[C] ST=	
2. Cant. Mtra			2. Filtración		Cant Tot ST=	
3. Solvente			3. Vol. obtenido:			
4. Vol. Solvente			4. Vol. absorbido x la muestra		CONCENTRACION	
5. Temperatura			5. Color filtrado		rpm/T :	
6. Tiempo			6. Olor filtrado		Presión:	
7. Estado			7. Conservación		Tiempo:	
8. Hora			8. Residuo		Vol. final:	
t:			V=		V=	

2. EXTRACCIÓN			SEPARACIÓN	FILTRACIÓN	ST - PA - FITOCOMP	OBSERVACIONES
HIRAT	LICUA	MACER				
1. pp droga/s			1. Separación		[C] ST=	
2. Cant. Mtra			2. Filtración		Cant Tot ST=	
3. Solvente			3. Vol. obtenido:			
4. Vol. Solvente			4. Vol. absorbido x la muestra		CONCENTRACION	
5. Temperatura			5. Color filtrado		rpm/T :	
6. Tiempo			6. Olor filtrado		Presión:	
7. Estado			7. Conservación		Tiempo:	
8. Hora			8. Residuo		Vol. final:	
t:			V=		V=	

3. EXTRACCIÓN			SEPARACIÓN	FILTRACIÓN	ST - PA - FITOCOMP	OBSERVACIONES
HIRAT	LICUA	MACER				
1. pp droga/s			1. Separación		[C] ST=	
2. Cant. Mtra			2. Filtración		Cant Tot ST=	
3. Solvente			3. Vol. obtenido:			
4. Vol. Solvente			4. Vol. absorbido x la muestra		2	
5. Temperatura			5. Color filtrado		rpm/T :	
6. Tiempo			6. Olor filtrado		Presión:	
7. Estado			7. Conservación		Tiempo:	
8. Hora			8. Residuo		Vol. final:	
t:			V=		V=	

Peso Droga

Vol Fin Extto

Cant Tot ST (PA)

Figura 7. Flujograma del ensayo de la actividad citotóxica

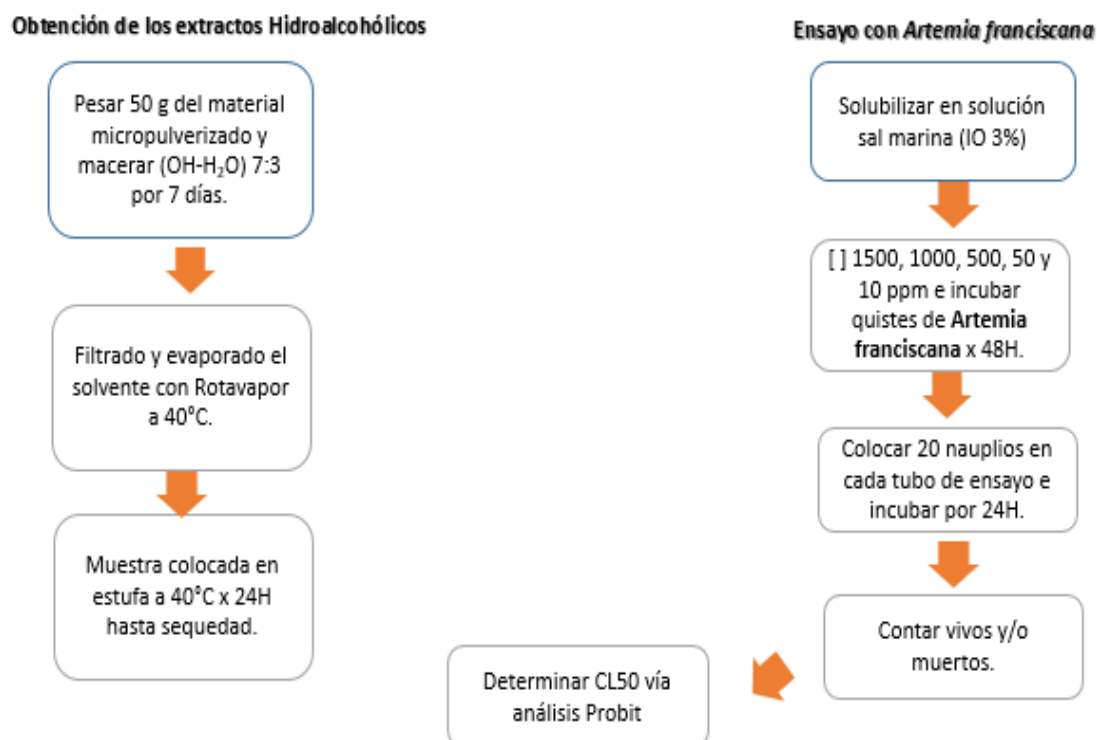


Figura 8. Flujo de trabajo del ensayo de la actividad antiinflamatoria *in vitro*

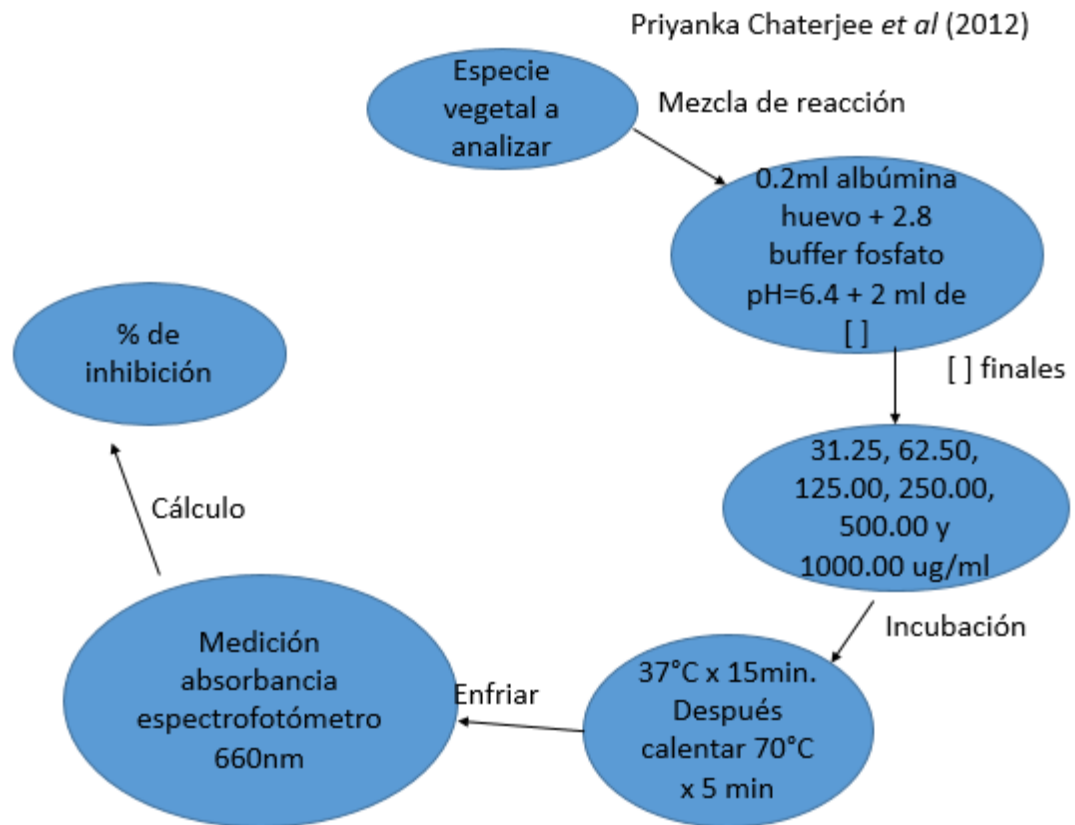


Figura 9. Flujograma del ensayo de la actividad antiinflamatoria *in vivo*

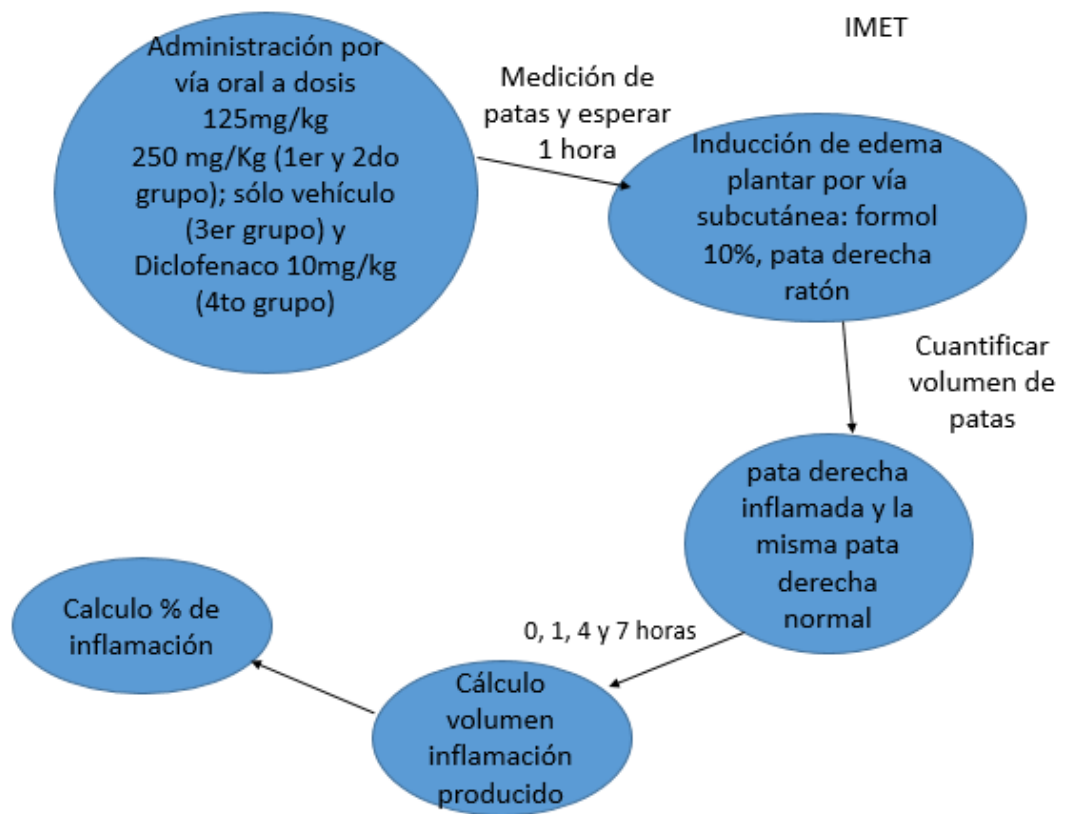



Figura 10. Constancia de certificación de especies vegetales



UNAP

Herbarium Amazonense – AMAZ
Centro de Investigación de
Recursos Naturales

CONSTANCIA Nº 039-2016-AMAZ-UNAP

EL COORDINADOR DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ-CIRNA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

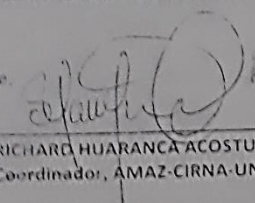

HACE CONSTAR:

Que, las muestras botánicas presentada por la FUNDACIÓN PARA EL DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AMAZONIA BAJA DEL PERÚ-FUNDESAB-PERÚ; es parte del proyecto que se realiza dentro del Círculo de Estudios de Plantas Medicinales, colectadas en diferentes puntos de la Región Loreto en la Amazonia Peruana, las cuales fueron verificados y determinados en este Herbarium Amazonense -AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indican:

N°	Cód. de Herbarium	FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMÚN
1	42451	APOCYNACEAE	<i>Aspidosperma excelsum</i> Beth.	"remocaspi"
2	41691	ARACEAE	<i>Dracontium lorentense</i> K. Krause	"jergón-sacha"
3	41694	BIGNONIACEAE	<i>Handroanthus obscurus</i> (Bureau & K.Schum.) Mattos	"tahuari-negro"
4	41687	CLUSIACEAE	<i>Garcinia macrophylla</i> Mart.	"charichuelo-grande"
5	41685	CLUSIACEAE	<i>Garcinia madruno</i> (Kunth) Hammel	"charichuelo-chico"
6	41697	EUPHORBIACEAE	<i>Aichornea castaneifolia</i> (Humb. & Bonpl. ex Willd.) A. Juss.	"iporuro"
7	41698	FABACEAE	<i>Bauhinia glabra</i> Jacq.	"pata-de-vaca"
8	41695	FABACEAE	<i>Cajanus cajan</i> (L.) Huth	"puspo-poroto"
9	42449	LAMIACEAE	<i>Vitex pseudolea</i> Rusby	"tahuari"
10	42448	MENISPERMACEAE	<i>Abuta grandifolia</i> (Mart.) Sandwith	"abuta", "trompetero sacha"
11	41689	MENISPERMACEAE	<i>Curarea toxicifera</i> (Wedell) barneby & Kruck	"sacha-ampihuasca"
12	41686	RUBIACEAE	<i>Remijia pedunculata</i> (H. Karst.) Flueck.	"chullachaqui-caspi"
13	41690	RUBIACEAE	<i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook. f. ex K. Schum.	"capirona"
14	42450	MALVACEAE	<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.	"bolaina-negra"
15	41696	MYRTACEAE	<i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh	"camu-camu"
16	41693	SOLANACEAE	<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal	"cocona"
17	41688	VERBENACEAE	<i>Verbena litoralis</i> Kunth	"verbena-negra"
18	41692	URTICACEAE	<i>Coussapoa asperifolia</i> Trecul	"renaco-caspi"

Se expide la presente constancia a los interesados para los fines que se estime conveniente.

Atentamente,

Mgo. RICHARD HUARANCA ACOSTUPA, M.Sc.
Coordinador, AMAZ-CIRNA-UNAP

Iquitos, 19 de Diciembre del 2016

Dirección Field, Nanay - Iquitos Perú
Apto. 495
Página 1
Centro de Investigaciones de Recursos Naturales



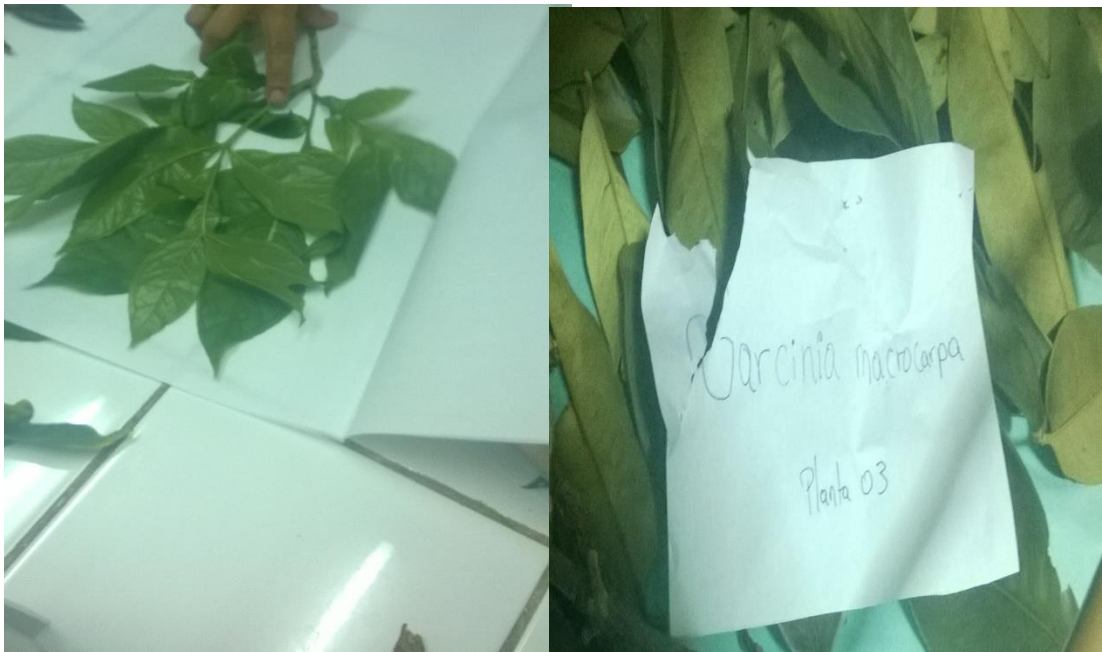
Fotografía 1: Comunidad de Tamshiyacu – Tahuayo



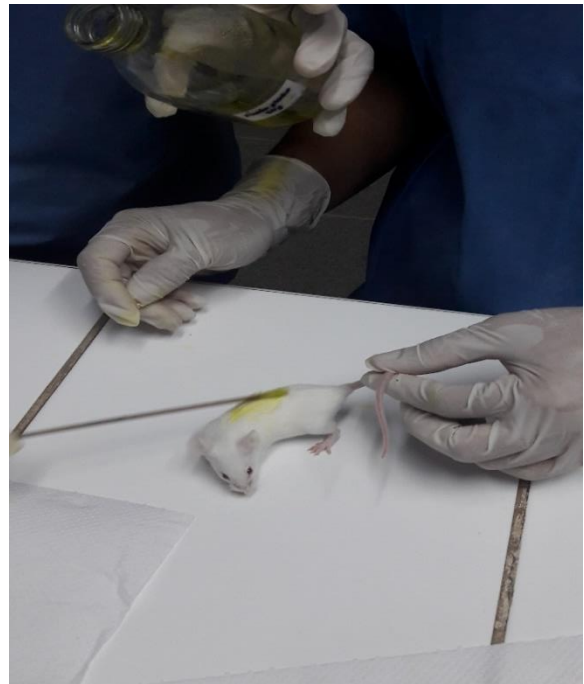
Fotografía 2: Arboretum Jenaro Herrera



Fotografía 3: Uso de materiales para la colecta de especies vegetales



Fotografía 4: Selección, limpieza y secado de especies vegetales



Fotografía 5. Identificación de ratones – actividad antiinflamatoria *in vivo*



Fotografía 6. Inducción oral de extractos a evaluar – actividad antiinflamatoria *in vivo*